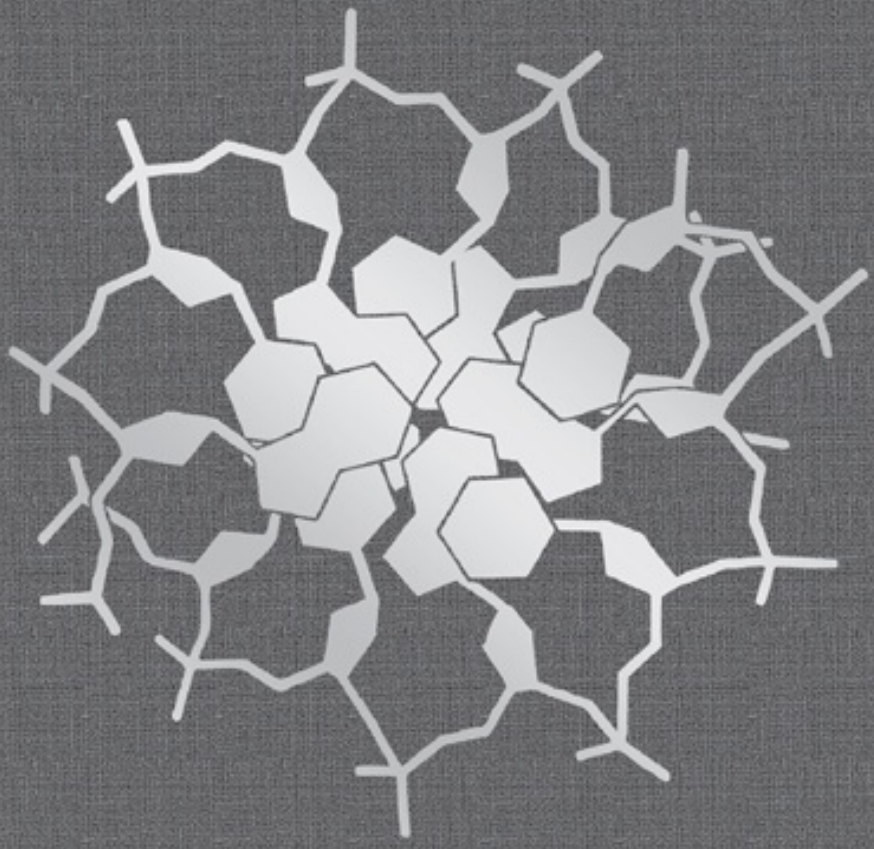
Sétima edição

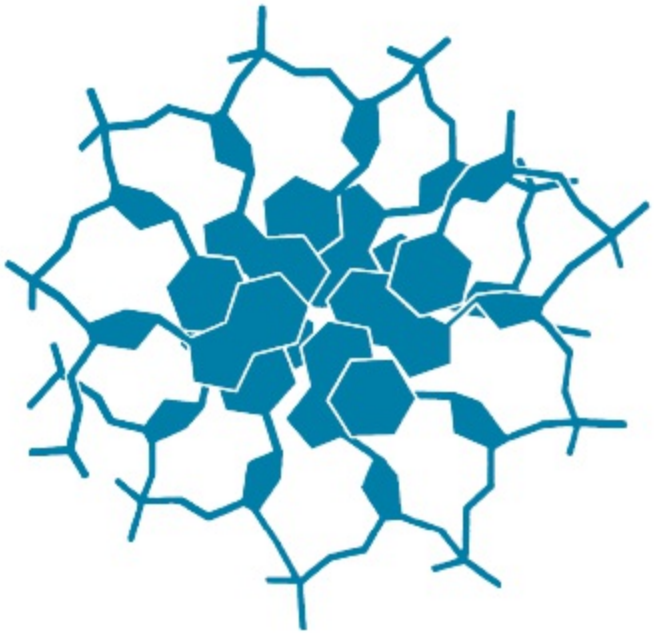
Bioquímica



Jeremy M. Berg
John L. Tymoczko
Lubert Stryer

gen | GUANABARA KOOGAN

Bioquímica



abdr
Respeite o direito autoral

O GEN | Grupo Editorial Nacional reúne as editoras Guanabara Koogan, Santos, Roca, AC Farmacêutica, Forense, Método, LTC, E.P.U. e Forense Universitária, que publicam nas áreas científica, técnica e profissional.

Essas empresas, respeitadas no mercado editorial, construíram catálogos inigualáveis, com obras que têm sido decisivas na formação acadêmica e no aperfeiçoamento de várias gerações de profissionais e de estudantes de Administração, Direito, Enfermagem, Engenharia, Fisioterapia, Medicina, Odontologia, Educação Física e muitas outras ciências, tendo se tornado sinônimo de seriedade e respeito.

Nossa missão é prover o melhor conteúdo científico e distribuí-lo de maneira flexível e conveniente, a preços justos, gerando benefícios e servindo a autores, docentes, livreiros, funcionários, colaboradores e acionistas.

Nosso comportamento ético incondicional e nossa responsabilidade social e ambiental são reforçados pela natureza educacional de nossa atividade, sem comprometer o crescimento contínuo e a rentabilidade do grupo.

Sétima edição

Bioquímica

Jeremy M. Berg
John L. Tymoczko
Lubert Stryer

com

Gregory J. Gatto, Jr.

Revisão Técnica
Deborah Schechtman
Professora Doutora do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP).
Pós-Doutorada pelo Department of Molecular Pharmacology, Stanford University, USA.
Doutorada pelo Department of Chemical Imunology, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel.
Mestrado em Biofísica pelo Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Bacharel em Ciências Biológicas Modalidade Médica (Biomedicina) pela Universidade do Rio de Janeiro (UNIRIO).

Tradução
Antonio José Magalhães da Silva Moreira (Capítulos 15 e 16)
Aydamari Faria Jr. (Capítulos 1 a 5)
Maria de Fátima Azevedo (Capítulos 17 a 19, 31 e 32)
Patricia Lydie Voeux (Capítulos 6 a 14, 20 a 30, 33 a 36)

gen | GUANABARA KOOGAN

■ Os autores deste livro e a EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA. empenharam seus melhores esforços para assegurar que as informações e os procedimentos apresentados no texto estejam em acordo com os padrões aceitos à época da publicação, *e todos os dados foram atualizados pelos autores até a data da entrega dos originais à editora*. Entretanto, tendo em conta a evolução das ciências da saúde, as mudanças regulamentares governamentais e o constante fluxo de novas informações sobre terapêutica medicamentosa e reações adversas a fármacos, recomendamos enfaticamente que os leitores consultem sempre outras fontes fidedignas, de modo a se certificarem de que as informações contidas neste livro estão corretas e de que não houve alterações nas dosagens recomendadas ou na legislação regulamentadora. *Adicionalmente, os leitores podem buscar por possíveis atualizações da obra em http://gen-io.grupogen.com.br.*

■ Os autores e a editora se empenharam para citar adequadamente e dar o devido crédito a todos os detentores de direitos autorais de qualquer material utilizado neste livro, dispondo-se a possíveis acertos posteriores caso, inadvertida e involuntariamente, a identificação de algum deles tenha sido omitida.

■ First published in the United States by
W.H. FREEMAN AND COMPANY, New York
Copyright © 2012, 2007, 2002 by W.H. Freeman and Company. Copyright © 1995, 1988, 1981, 1975 by Lubert Stryer
All Rights Reserved

■ Publicado originalmente nos Estados Unidos
por W.H. FREEMAN AND COMPANY, New York
Copyright © 2012, 2007, 2002 by W.H. Freeman and Company
Copyright © 1995, 1988, 1981, 1975 by Lubert Stryer
Todos os Direitos Reservados

■ Direitos exclusivos para a língua portuguesa
Copyright © 2014 by
EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA.
Uma editora integrante do GEN | Grupo Editorial Nacional
Travessa do Ouvidor, 11
Rio de Janeiro – RJ – CEP 20040-040
Tels.: (21) 3543-0770/(11) 5080-0770 | Fax: (21) 3543-0896
www.editoraguanabara.com.br | www.grupogen.com.br | editorial.saude@grupogen.com.br

■ Reservados todos os direitos. É proibida a duplicação ou reprodução deste volume, no todo ou em parte, em quaisquer formas ou por quaisquer meios (eletrônico, mecânico, gravação, fotocópia, distribuição pela Internet ou outros), sem permissão, por escrito, da EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA.

■ Produção digital: Geethik

■ Ficha catalográfica

B432b
7. ed.

Berg, Jeremy Mark, 1958-
Bioquímica / Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer; com Gregory J. Gatto, Jr.; revisão técnica Deborah Schechtman; tradução Antonio José Magalhães da Silva Moreira, Aydamari Faria Jr., Maria de Fátima Azevedo, Patricia Lydie Voeux. – 7. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
il.

ISBN: 978-8-5277-2387-9

1. Bioquímica. I. Tymoczko. John L., 1948-. II. Stryer, Lubert, 1938-. III. Título.

13-06958.

CDD: 612.015
CDU: 612.015

Dedicatória

Aos nossos mestres e nossos alunos.

Sobre os autores

Jeremy M. Berg recebeu seu B.S. e M.S. em química em Stanford (onde fez pesquisas com Keith Hodgson e Lubert Stryer), e seu Ph.D. em química foi obtido em Harvard com Richard Holm. Em seguida, completou seu pós-doutorado com Carl Pabo em biofísica na Johns Hopkins University School of Medicine. Ele foi professor assistente no Departament of Chemistry no Johns Hopkins no período de 1986 até 1990. Depois ele se tornou professor e diretor do Department of Biophysics and Biophysical Chemistry da Johns Hopkins University School of Medicine, onde permaneceu até 2003. Então se tornou o diretor do National Institute of General Medical Sciences no National Institutes of Health. Jeremy M. Berg é *fellow* eleito da American Association for the Advancement of Science e membro eleito do Institute of Medicine da National Academy of Sciences. Recebeu a American Chemical Society Award in Pure Chemistry (1994) e a Eli Lilly Award for Fundamental Research in Biological Chemistry (1995), foi nomeado Maryland Outstanding Young Scientist of the Year (1995), recebeu a Harrison Howe Award (1997), a Distinguished Service Award da Biophysical Society (2009) e a Howard K. Schachman Public Service Award da American Society for Biochemistry and Molecular Biology (2011). Ele também ganhou numerosas comendas na área de ensino, inclusive a W. Barry Wood Teaching Award (escolhida por estudantes de medicina), a Graduate Student Teaching Award e a Professor's Teaching Award for the Preclinical Sciences. É coautor, com Stephen J. Lippard, do livro *Principles of Bioinorganic Chemistry*.

John L. Tymoczko é Towsley Professor of Biology no Carleton College, onde ensina desde 1976. Atualmente ensina bioquímica, bioquímica laboratorial, oncogenes e biologia molecular do câncer e bioquímica do exercício. Também leciona no curso fluxo de energia nos sistemas biológicos. O professor Tymoczko recebeu seu B.A. da University of Chicago em 1970 e seu Ph.D. em bioquímica da University of Chicago, com Shutsung Liao, no Ben May Institute for Cancer Research. Ele fez o pós-doutorado com Hewson Swift do Department of Biology na University of Chicago. O foco de sua pesquisa é receptores de esteroides, partículas de ribonucleoproteínas e enzimas de processamento proteolítico.

Lubert Stryer é Winzer Professor of Cell Biology, Emeritus, na School of Medicine e Professor of Neurobiology, Emeritus, na Stanford University, onde é membro do corpo docente desde 1976. Recebeu seu M.D. da Harvard Medical School. O Professor Stryer ganhou muitas comendas por sua pesquisa da ação recíprocra entre luz e vida, inclusive a Eli Lilly Award of Fundamental Research in Biological Chemistry, Distinguished Inventors Award of the Intellectual Property Owners' Association. Foi eleito para a National Academy of Sciences e para a American Philosophical Society. Recebeu a National Medal of Science em 2006. A publicação de sua primeira edição de *Bioquímica*, em 1975, transformou o ensino de bioquímica.

Gregory J. Gatto, Jr. recebeu seu B.A. em química da Princeton University, onde trabalhou com Martin F. Semmelhack e recebeu o Everett S. Wallis Prize em química orgânica. Em 2003, recebeu seu M.D. e Ph.D. da Johns Hopkins University School of Medicine, onde estudou a biologia estrutural do reconhecimento do sinal de direcionamento para os peroxissomas com Jeremy M. Berg

e recebeu a Michael A. Shanoff Young Investigator Research Award. Depois completou seu pós-doutorado em 2006 com Christopher T. Walsh na Harvard Medical School, onde estudou a biossíntese dos imunossupressores macrolídeos. Atualmente é pesquisador na Heart Failure Discovery Perfomance Unit na GlaxoSmithKline Pharmaceuticals.

Prefácio

Durante a preparação desta sétima edição da obra *Bioquímica*, equilibramos o desejo de apresentar os mais recentes avanços com a necessidade de tornar o conteúdo da bioquímica o mais claro possível para o estudante que está abordando o assunto pela primeira vez. Há muito tempo os preceptores e os alunos sabem que essa obra oferece:

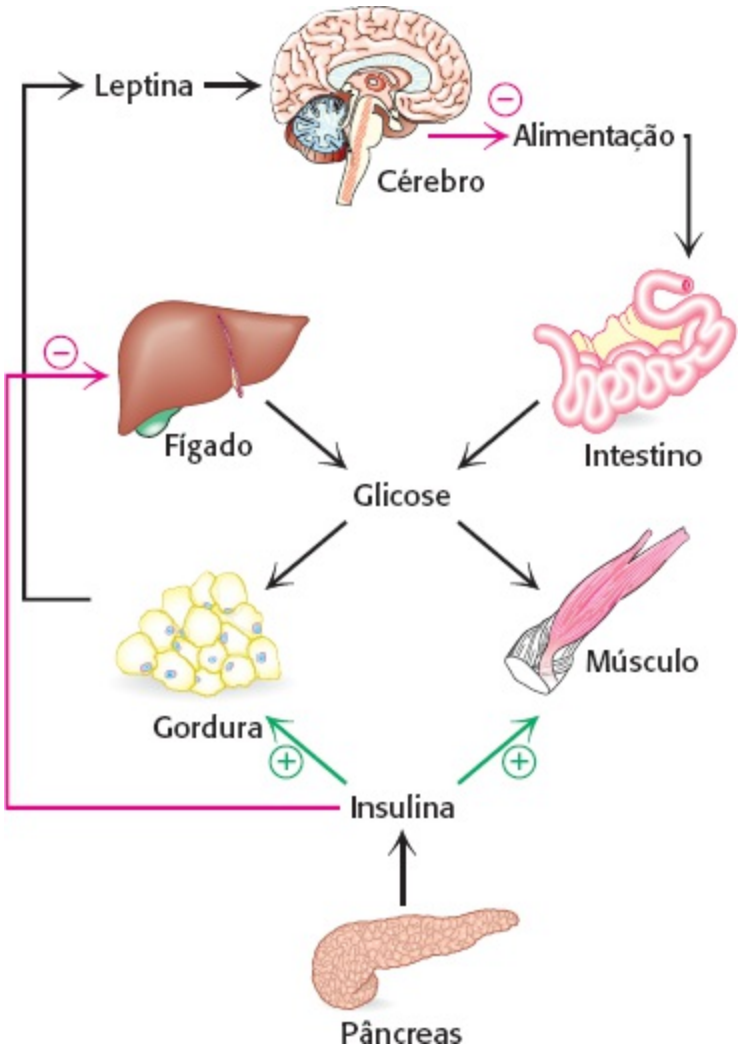
- **Linguagem clara.** Os termos usados são bastante acessíveis. A organização é lógica, direta e guia o leitor por processos, ajudando-o a navegar por vias e mecanismos complexos.
- **Ilustrações de conceitos únicos.** Cada ilustração mostra um tópico por vez, de modo que "conta a história" de um mecanismo, via ou processo sem causar distração por não ter detalhes em excesso.
- **Relevância fisiológica.** A bioquímica é o estudo da vida na menor escala, e nosso objetivo sempre foi ajudar os estudantes a conectar a bioquímica às suas vidas. As vias e os processos são apresentados em um contexto fisiológico, de modo que o leitor possa compreender como a bioquímica atua em diferentes partes do corpo e sob diferentes condições ambientais e hormonais.
- **Aplicações clínicas.** Sempre que apropriado, as vias e os mecanismos são aplicados a doenças e saúde. Essas aplicações mostram aos estudantes como a bioquímica é importante e reforça os conceitos ensinados. (Veja lista completa na página xi.)
- **Perspectiva evolucionária.** A evolução é evidente nas estruturas e nas vias da bioquímica e mostramos essa interação ao longo do livro. (Veja lista completa na página x.)

Novidades desta edição

A cada dia que passa os pesquisadores fazem novas descobertas em bioquímica. Esta sétima edição leva em consideração as descobertas que modificaram a maneira como encaramos os conceitos fundamentais da bioquímica e da saúde humana. As novidades incluem:

- **Integração do metabolismo em um novo contexto.** Novos dados sobre o papel das leptinas na fome e na saciedade influenciaram significativamente o modo como encaramos a obesidade e a crescente "epidemia" de diabetes melito. Nesta edição abordamos a integração do metabolismo no contexto de dieta e obesidade.
- **Novos capítulos sobre regulação gênica.** Com o propósito de apresentar o conhecimento cada vez maior dos aspectos bioquímicos da regulação gênica eucariota, aumentamos substancialmente a discussão sobre regulação e dividimos o capítulo das edições anteriores nos Capítulos 31 (Controle da Expressão Gênica nos Procariotos) e 32 (Controle da Expressão Gênica em Eucariotos). Neles são descritas descobertas recentes, como *quorum sensing* em procariotos, células-tronco pluripotentes induzidas e a participação dos microRNA na regulação da expressão gênica.
- **Técnicas experimentais atualizadas e elucidadas**. Os Capítulos 3 (Estudo das Proteínas e dos Proteomas), 5 (Estudo dos Genes e Genomas) e 6 (Estudo da Evolução e da Bioinformática) foram revisados com o propósito de mostrar aos estudantes os benefícios e as limitações das técnicas que

utilizarão no laboratório. Por exemplo, foram ampliadas e esmiuçadas as descrições da espectrometria de massa e cristalografia por raios X. Além disso, foram descritas e explicadas novas técnicas, como sequenciamento de nova geração e PCR em tempo real no contexto de sua importância para a pesquisa moderna em bioquímica. (Veja lista completa na página xii.)



Capítulo 27 Representação esquemática que ilustra algumas das muitas vias metabólicas que precisam ser coordenadas para atender às demandas existenciais.

Avanços recentes

Entre os avanços e os novos tópicos apresentados nesta sétima edição estão:

- Osteogênese imperfeita (Capítulo 2)
- Proteínas intrinsecamente desestruturadas e proteínas metamórficas (Capítulo 2)
- Atualizações recentes das doenças relacionadas com enovelamento incorreto das proteínas (Capítulo 2)
- Utilização da tecnologia de DNA recombinante na purificação de proteínas (Capítulo 3)
- Discussão ampliada da espectrometria de massa e cristalografia por raios X (Capítulo 3)
- Métodos de sequenciamento de nova geração (Capítulo 5)
- PCR em tempo real (Capítulo 5)

• Microarranjos (*microarrays*) de DNA (Capítulo 5)
• Intoxicação por monóxido de carbono (Capítulo 7)
• Estudos monomoleculares da cinética enzimática (Capítulo 8)
• Miosinas como modelo de estratégia catalítica da hidrólise de ATP (Capítulo 9)
• Glicobiologia e glicômica (Capítulo 11)
• Doença de Hurler (Capítulo 11)
• *Influenza* aviária H5N1 (Capítulo 11)
• Balsas *lipídicas* (*lipid rafts*) (Capítulo 12)
• Transferrina como exemplo de endocitose mediada por receptor (Capítulo 12)
• Síndrome do QT longo e arritmia causada pela inibição dos canais de potássio (Capítulo 13)
• Problemas no ciclo do ácido cítrico e o desenvolvimento de câncer (Capítulo 17)
• Síntese de uma rubisco (*ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase*) mais eficiente (Capítulo 20)
• Estrutura da sintetase de ácido graxo de mamíferos (Capítulo 22)
• Vias de recuperação de pirimidina (Capítulo 25)
• Associação física das enzimas nas vias metabólicas (Capítulo 25)
• Fosfatase do ácido fosfatídico na regulação do metabolismo lipídico (Capítulo 26)
• Regulação do movimento de SCAP-SREBP no metabolismo do colesterol (Capítulo 26)
• Mutações no receptor de LDL (Capítulo 26)
• Participação de HDL na proteção contra arteriosclerose (Capítulo 26)

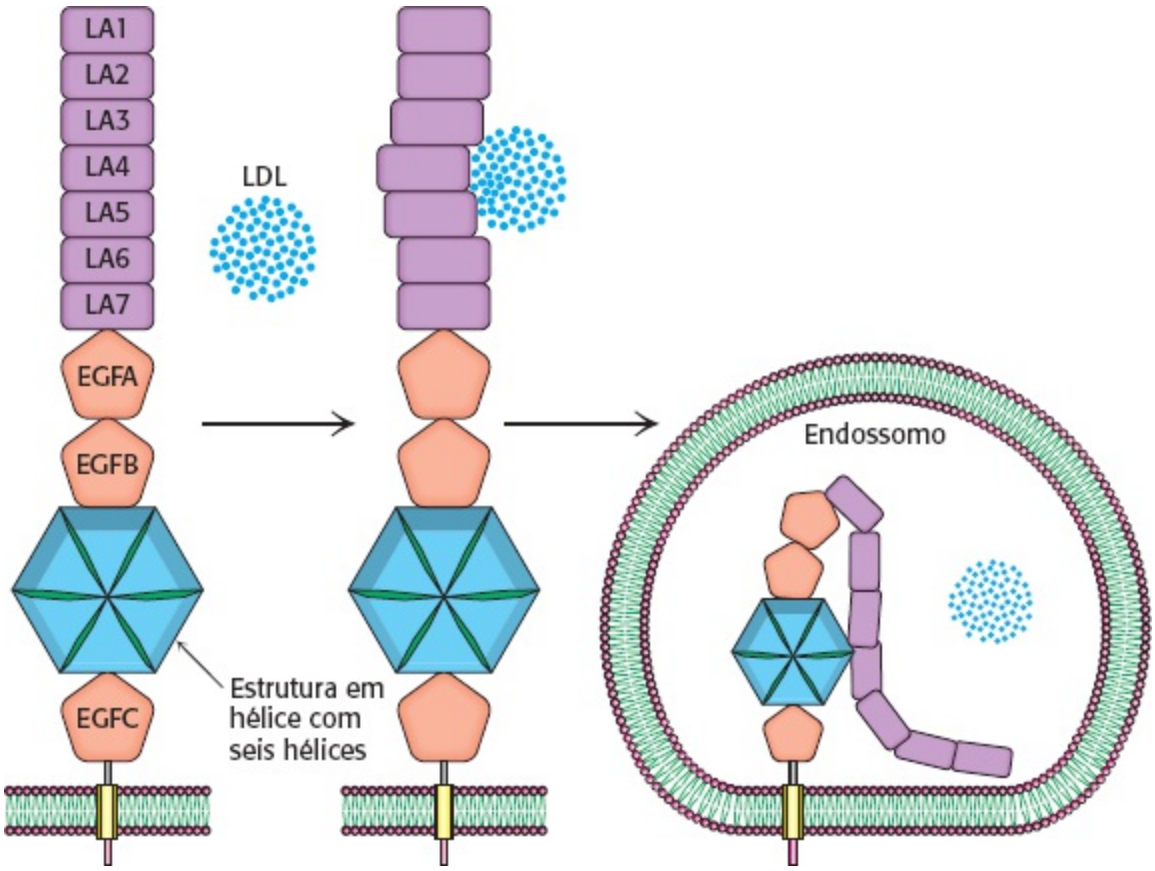


Figura 26.24 O receptor de LDL libera a LDL no endossomo. [De I. D. Campbell, *Biochem. Soc. Trans*. 31:1107-1114, 2003, Fig. 1A.]

- Inibidores da aromatase no tratamento de cânceres de mama e ovário (Capítulo 26)
- Participação da leptina na homeostase calórica de longo termo (Capítulo 27)
- Obesidade e diabetes melito (Capítulo 27)
- Exercício físico e seus efeitos na bioquímica celular (Capítulo 27)
- Detalhes atualizados do mecanismo de ação da helicase (Capítulo 28)
- Detalhes atualizados do mecanismo de ação da topoisomerase (Capítulo 28)
- *Riboswitches* (Capítulo 29)
- Produção de pequenos RNA reguladores (Capítulo 29)
- Doença da substância branca evanescente (Capítulo 30)
- *Quorum sensing* (Capítulo 31)
- Biofilmes (Capítulo 31)
- Células-tronco pluripotentes induzidas (Capítulo 32)
- O papel dos microRNA na regulação gênica (Capítulo 32)
- O mecanismo de ação das vacinas (Capítulo 34)
- A estrutura dos domínios da cabeça de miosina (Capítulo 35).

Figura 32.27 Ação do microRNA.

Questões novas no final dos capítulos

A melhor maneira de aprender bioquímica é praticar. Com o propósito de ajudar os estudantes a fazê-lo, aumentamos em 50% o número de questões ao final dos capítulos. Além das muitas questões que avaliam os conhecimentos de bioquímica e a capacidade de utilizar esse conhecimento, há três categorias de questões que exigem a aplicação de habilidades específicas de resolução.

- **Questões relacionadas com os mecanismos de ação**, nas quais os estudantes precisam sugerir ou elaborar um mecanismo químico.
- **Questões relacionadas com a interpretação de dados**, nas quais são feitas perguntas sobre um conjunto de dados apresentados como gráfico ou tabela. Essas questões mostram aos estudantes como se chega às conclusões científicas.
- **Questões de integração de capítulos**, nas quais os estudantes utilizam informações de vários capítulos para chegar a uma solução. Essas questões reforçam a conscientização do estudante de que os diferentes aspectos da bioquímica estão interligados.

Ao final do livro, são apresentadas soluções sucintas para essas questões.

Visualização da estrutura molecular

Todas as estruturas moleculares foram escolhidas e preparadas por Jeremy Berg e Gregory Gatto. Para ajudar os estudantes a compreender essas estruturas, incluímos as seguintes ferramentas:

- Um **texto introdutório sobre o modelo molecular** explica os diferentes tipos de modelos de proteína e examina os pontos fortes e fracos (ver apêndices dos Capítulos 1 e 2).
- As **legendas das figuras** direcionam os estudantes explicitamente para os elementos essenciais de cada modelo.
- Uma **grande variedade de tipos de estruturas moleculares** é apresentada, inclusive preparações mais claras das proteínas de membranas.
- Para a maioria dos modelos moleculares, o **número PDB** no final da legenda das figuras torna mais fácil para o leitor ter acesso ao arquivo utilizado na criação da estrutura a partir do *website* do Protein Data Bank (www.pdb.org), o qual contém diversas ferramentas que possibilitam a visualização e análise das estruturas.
- **Figuras "vivas"** para a maioria das estruturas moleculares disponíveis no site www.whfreeman.com/ berg7e em Jmol que possibilitam a **rotação de moléculas tridimensionais** e a visualização de outras representações disponíveis online (textos em inglês).

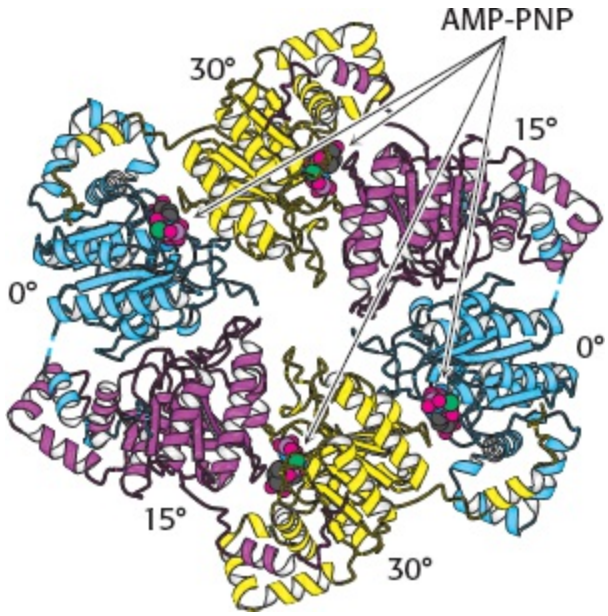


Figura 28.12 Assimetria da helicase. *Observe* que apenas quatro das subunidades, aquelas mostradas em azul e amarelo, ligam-se ao AMP-PNP. [Desenhada a partir de 1E0K.pdb.]

Evolução molecular

Este ícone sinaliza o início de muitas discussões sobre semelhanças das proteínas ou sobre a evolução molecular.

Apenas os aminoácidos L constituem as proteínas (p. 29)
Por que esse conjunto de 20 aminoácidos? (p. 35)
Hemoglobina fetal (p. 207)
Globinas adicionais no genoma humano (p. 213)
Tríades catalíticas em enzimas hidrolíticas (p. 262)
Classes importantes de enzimas de clivagem de peptídios (p. 264)
Sítios ativos com zinco em anidrases carbônicas (p. 273)
Cerne catalítico em comum nas enzimas de restrição tipo II (p. 280)
Domínios de NTPase com alças-P (p. 286)
Cerne catalítico conservado nas proteína quinases (p. 304)
Por que diferentes tipos sanguíneos estão presentes na população humana? (p. 337)
Membranas de *Archaea* (p. 352)
Bombas iônicas (p. 376)
ATPases do tipo P (p. 380)
Cassetes de ligação de ATP (p. 380)
Comparações das sequências dos canais de Na^+ e Ca^{2+} (p. 388)
Proteínas G pequenas (p. 420)
Metabolismo no mundo de RNA (p. 451)
Por que a glicose é uma fonte proeminente de energia? (p. 459)
Sítios de ligação para o NAD^+ nas desidrogenases (p. 473)
Superfamília de transportadores facilitadores principais (p. 481)
Formas isozímicas da lactato desidrogenase (p. 494)
Evolução da glicólise e da gliconeogênese (p. 495)
Complexo a-cetoglutarato desidrogenase (p. 511)
Domínios da succinil-CoA sintase (p. 513)
Evolução do ciclo do ácido cítrico (p. 522)
Evolução da mitocôndria (p. 531)
Estrutura do citocromo *c* conservada (p. 547)
Aspectos conservados da ATP sintase e das proteínas G (p. 554)
Proteínas desacopladoras correlatas (p. 561)
Evolução dos cloroplastos (p. 572)
Origens evolucionárias da fotossíntese (p. 588)
Evolução da via C_4 (p. 604)
Coordenação do ciclo de Calvin com a via das pentoses fosfato (p. 613)
Evolução da glicogênio fosforilase (p. 631)
Sofisticação cada vez maior da regulação da glicogênio fosforilase (p. 631)
Família da a-amilase (p. 633)
Um *motif* (motivo) recorrente na ativação dos grupos carboxila (p. 649)
A via da ubiquitina e o proteassoma têm equivalentes procarióticos (p. 681)

Família de enzimas dependentes de piridoxal (p. 688)
Evolução do ciclo da ureia (p. 692)
Domínio da NTPase com alça P na nitrogenase (p. 714)
Transaminases semelhantes determinam a quiralidade dos aminoácidos (p. 719)
Inibição por retroalimentação (*feedback*) (p. 730)
Etapas recorrentes na síntese do anel purina (p. 747)
Ribonucleotídio redutases (p. 753)
Aumento dos níveis de urato na evolução dos primatas (p. 760)
Superfamília do citocromo P450 (p. 789)
DNA polimerases (p. 827)
Timina e a fidelidade da mensagem genética (p. 847)
Fatores sigma na transcrição bacteriana (p. 864)
Semelhanças na transcrição entre Archaea e eucariotos (p. 875)
Evolução do *splicing* catalisado por spliceossomo (p. 887)
Classes de aminoacil-tRNA sintetases (p. 903)
Composição do ribossomo primordial (p. 906)
Proteínas G homólogas (p. 909)
Família de proteínas com domínios de conexão com ligante em comum (p. 932)
Evolução independente dos sítios de ligação do DNA de proteínas reguladoras (p. 933)
Regulação por sítios atenuadores (p. 938)
Ilhotas de CpG (p. 952)
Elemento de resposta ao ferro (p. 958)
miRNA na evolução gênica (p. 960)
Família de receptores odoríferos (p. 967)
Evolução dos fotorreceptores (p. 977)
Enovelamento de imunoglobulina (p. 992)
Correlação da actina e hexoquinase e proteínas procarióticas (p. 1027)

Aplicações clínicas

Este ícone sinaliza o início de uma aplicação clínica no texto. Correlações clínicas menores aparecem no texto quando apropriado.

Osteogênese imperfeita (p. 47)
Doenças consequentes ao enovelamento incorreto das proteínas (p. 57)
Modificação proteica e escorbuto (p. 59)
Detecção de antígeno com ELISA (p. 90)
Peptídeos sintéticos como medicamentos (p. 98)
Terapia gênica (p. 169)
Ressonância magnética funcional (p. 199)
Envenenamento por monóxido de carbono (p. 207)
Anemia falciforme (p. 211)
Talassemia (p. 212)
Deficiência de aldeído desidrogenase (p. 234)
Ação da penicilina (p. 246)
Inibidores da protease (p. 266)
Anidrase carbônica e osteoporose (p. 268)
Isoenzimas como sinal de lesão tecidual (p. 299)
Enfisema (p. 308)
Vitamina K (p. 312)
Hemofilia (p. 313)
Ativador do plasminogênio tecidual (p. 314)
Monitoramento das variações na hemoglobina glicosilada (p. 327)
Eritropoetina (p. 332)
Doença de Hurler (p. 333)
Grupos sanguíneos (p. 337)
Doença da célula I (p. 338)
Ligação do vírus influenza (p. 341)
Aplicações clínicas dos lipossomos (p. 356)
Ácido acetilsalicílico e ibuprofeno (p. 360)
Digitalina e insuficiência cardíaca congênita (p. 379)
Resistência a múltiplos fármacos (p. 380)
Síndrome do QT longo (p. 394)
Vias de transdução de sinais e câncer (p. 422)
Anticorpos monoclonais como agentes contra o câncer (p. 422)
Inibidores de proteína quinases como agentes contra o câncer (p. 423)
Vitaminas (p. 445)
Intolerância à lactose (p. 475)
Galactosemia (p. 476)
Câncer e treinamento físico (p. 482)
Deficiência de fosfatase (p. 518)
Defeitos no ciclo do ácido cítrico e o desenvolvimento de câncer (p. 519)

Beribéri e envenenamento por mercúrio (p. 521)
Doenças mitocondriais (p. 562)
Anemia hemolítica (p. 613)
Deficiência de glicose 6-fosfato (p. 615)
Doenças de armazenamento de glicogênio (p. 638)
Deficiência de carnitina (p. 650)
Síndrome de Zellweger (p. 656)
Cetose diabética (p. 659)
Uso dos inibidores ácido graxo sintase como fármacos (p. 667)
Efeitos do ácido acetilsalicílico nas vias de sinalização (p. 669)
Doenças resultantes de defeitos nas proteínas E3 (p. 680)
Doenças resultantes de ubiquitinação alterada (p. 683)
Uso de inibidores do proteossoma no tratamento da tuberculose (p. 683)
Defeitos hereditários do ciclo da ureia (hiperamonemia) (p. 692)
Alcaptonúria, doença da urina do xarope de bordo (leucinose), e fenilcetonúria (p. 701)
Homocisteína em níveis elevados e doença vascular (p. 723)
Distúrbios hereditários do metabolismo da porfirina (p. 736)
Fármacos antineoplásicos bloqueiam a síntese de timidilato (p. 755)
Adenosina desaminase e imunodeficiência combinada grave (p. 758)
Gota (p. 759)
Síndrome de Lesch-Nyhan (p. 760)
Ácido fólico e espinha bífida (p. 761)
Segundos mensageiros derivados de esfingolipídios e diabetes melito (p. 771)
Síndrome de angústia respiratória e doença de Tay-Sachs (p. 771)
Uso diagnóstico dos níveis sanguíneos de colesterol (p. 780)
Hipercolesterolemia e aterosclerose (p. 782)
Mutações no receptor de LDL (p. 783)
O papel da HDL na proteção contra arteriosclerose (p. 784)
Controle clínico dos níveis de colesterol (p. 785)
Inibidores da aromatase no tratamento dos cânceres de mama e de ovário (p. 791)
Raquitismo e vitamina D (p. 792)
Antibióticos direcionados para a DNA girase (p. 837)
Bloqueio da telomerase para o tratamento do câncer (p. 843)
Doença de Huntington (p. 848)
Reparo defeituoso do DNA e câncer (p. 848)
Detecção de carcinógenos (teste de Ames) (p. 849)
Antibióticos inibidores da transcrição (p. 867)
Linfoma de Burkitt e leucemia de célula B (p. 875)
Doenças de *splicing* defeituoso do RNA (p. 883)
Doença da substância branca evanescente (p. 915)
Antibióticos que inibem a síntese de proteínas (p. 915)
Difteria (p. 916)
Ricina, um inibidor letal da síntese de proteínas (p. 917)
Células-tronco pluripotentes induzidas (p. 950)
Esteroides anabólicos (p. 954)
Daltonismo (p. 978)
O uso de capsaicina no tratamento da dor (p. 982)

Imunossupressores (p. 998)
MHC e rejeição de transplante (p. 1006)
Vacina contra AIDS (p. 1007)
Doenças autoimunes (p. 1008)
Sistema imune e câncer (p. 1008)
Vacinas (p. 1009)
Doença de Charcot-Marie-Tooth (p. 1026)
Taxol (p. 1027)

Ferramentas e técnicas

A sétima edição de *Bioquímica* oferece aos leitores três capítulos que descrevem as ferramentas e as técnicas bioquímicas: "Estudo das Proteínas e dos Proteomas" (Capítulo 3), "Estudo dos Genes e Genomas" (Capítulo 5) e "Estudo da Evolução e da Bioinformática" (Capítulo 6). Outras técnicas experimentais são apresentadas ao longo do livro, de acordo com o assunto apropriado.

Estudo das proteínas e dos proteomas (Capítulo 3)

Purificação de proteínas (p. 68)
Centrifugação diferencial (p. 70)
Precipitação (*salting out*) (p. 70)
Diálise (p. 71)
Cromatografia de filtração em gel (p. 71)
Cromatografia de troca iônica (p. 71)
Cromatografia de afinidade (p. 72)
Cromatografia líquida de alta pressão (p. 73)
Eletroforese em gel (p. 73)
Focalização isoelétrica (p. 75)
Eletroforese bidimensional (p. 76)
Avaliação qualitativa e quantitativa da purificação de proteínas (p. 77)
Ultracentrifugação (p. 78)
Degradação de Edman (p. 82)
Sequenciamento de proteínas (p. 84)
Produção dos anticorpos policlonais (p. 88)
Produção dos anticorpos monoclonais (p. 88)
Ensaio enzimático imunoabsorvente (ELISA) (p. 90)
Western blotting (p. 91)
Microscopia de fluorescência (p. 92)
Proteína fluorescente verde como marcador (p. 92)
Imunomarcação ou microscopia imunoeletrônica (p. 93)
Espectrometria de massa MALDI-TOF (p. 94)
Espectrometria de massa sequencial (*tandem*) (p. 95)
Análise proteômica por espectrometria de massa (p. 96)
Peptídeos sintéticos automatizados em fase sólida (p. 97)
Cristalografia de raios X (p. 100)
Espectroscopia por ressonância magnética (p. 103)
Espectroscopia NOESY (p. 104)

Estudo das proteínas (outros capítulos)

Base da fluorescência na proteína fluorescente verde (p. 60)
Uso de inibidores irreversíveis para mapear o sítio ativo (p. 243)
Estudos enzimáticos com anticorpos catalíticos (p. 245)
Estudos de moléculas isoladas (p. 248)

Estudo dos genes e genomas (Capítulo 5)

Análise com enzimas de restrição (p. 143)
Técnicas *Southern blotting* e *Northern blotting* (p. 144)
Método didesoxi de Sanger de sequenciamento de DNA (p. 145)
Síntese em fase sólida de ácidos nucleicos (p. 146)
Reação em cadeia da polimerase (PCR) (p. 147)
Tecnologia do DNA recombinante (p. 149)
Clonagem de DNA em bactérias (p. 151)
Criação de bibliotecas de cDNA (p. 156)
Técnicas de mutagênese (p. 158)
Sequenciamento de nova geração (p. 162)
PCR quantitativa (p. 163)
Exame dos níveis de expressão (microarranjos de DNA) (p. 164)
Introdução de genes em células eucarióticas (p. 165)
Animais transgênicos (p. 166)
Interrupção gênica (p. 166)
Interrupção gênica por RNA de interferência (p. 167)
Plasmídios indutores de tumores (p. 168)

Estudo dos genes (outros capítulos)

Equilíbrio de sedimentação por gradiente de densidade (p. 121)
Imunoprecipitação de cromatina (ChIP) (p. 951)

Estudo da evolução e da bioinformática (Capítulo 6)

Métodos de comparação de sequência (p. 176)
Métodos de alinhamento de sequência (p. 178)
Estimativa do significado estatístico dos alinhamentos (por embaralhamento) (p. 179)
Matrizes de substituição (p. 180)
Realização de pesquisa em banco de dados BLAST (p. 183)
Sequência modelo (p. 186)
Detecção de motivos repetidos (p. 186)
Mapeamento de estruturas secundárias por meio de comparações de sequência de RNA (p. 188)
Construção de árvores evolutivas (p. 189)
Química combinatória (p. 190)
Evolução molecular no laboratório (p. 191)

Outras técnicas

Ressonância magnética funcional (RMf) (p. 199)
Sequenciamento de carboidratos por espectrometria de massa MOLDI-TOF (p. 339)
O uso de lipossomos na investigação de permeabilidade de membrana (p. 355)
O uso do gráfico de hidropatia para localizar hélices transmembranares (p. 362)
Recuperação de fluorescência após fotodegradação (FRAP) para determinação da difusão lateral nas membranas (p. 363)
Técnica de fixação de placas para medição das atividades de canais (p. 385)
Determinação do potencial redox (p. 532)

Agradecimentos

Como sempre, nosso primeiro agradecimento é para os estudantes. Nenhum termo foi escrito e nenhuma imagem foi criada sem a consciência de que alunos inteligentes e engajados reconheceriam imediatamente quaisquer ambiguidades ou indefinições. Somos gratos também aos nossos colegas que apoiaram, aconselharam, orientaram e suportaram conosco essa tarefa tão árdua. Agradecemos ainda aos colegas em todos os recantos do planeta que pacientemente responderam às nossas questões e compartilharam suas aplicações clínicas sobre os avanços mais recentes. Manifestamos nosso apreço a Susan J. Baserga e Erica A. Champion da Yale University School of Medicine por suas fantásticas contribuições para a revisão do Capítulo 29 na sexta edição desta obra. Além disso, não há como descrever nossa gratidão aos revisores desta nova edição. Seus comentários, sugestões e estímulos foram imensamente valiosos na manutenção da excelência das edições anteriores. Esses revisores são:

Fareed Aboul-Ela
Louisiana State University

Paul Adams
University of Arkansas, Fayetteville

Kevin Ahern
Oregon State University

Edward Behrman
Ohio State University

Donald Beitz
Iowa State University

Sanford Bernstein
San Diego State University

Martin Brock
Eastern Kentucky University

W. Malcom Byrnes
Howard University College of Medicine

C. Britt Carlson
Brookdale Community College

Graham Carpenter
Vanderbilt University

Jun Chung
Louisiana State University

Michael Cusanovich
University of Arizona

David Daleke
Indiana University

Margaret Daugherty
Colorado College

Dan Davis

University of Arkansas, Fayetteville

Mary Farwell
East Carolina University

Brent Feske
Armstrong Atlantic University

Wilson Francisco
Arizona State University

Masaya Fujita
University of Houston, University Park

Peter Gegenheimer
University of Kansas

John Goers
California Polytechnic University, San Luis Obispo

Neena Grover
Colorado College

Paul Hager
East Carolina University

Frans Huijing
University of Miami

Nitin Jain
University of Tennessee

Gerwald Jogl
Brown University

Kelly Johanson
Xavier University of Louisiana

Todd Johnson
Weber State University

Michael Kalafatis
Cleveland State University

Mark Kearly
Florida State University

Sung-Kun Kim
Baylor University

Roger Koeppe
University of Arkansas, Fayetteville

Dmitry Kolpashchikov
University of Central Florida

John Koontz
University of Tennessee

Glen Legge
University of Houston, University Park

John Stephen Lodmell
University of Montana

Timothy Logan

Florida State University

Michael Massiah
Oklahoma State University

Diana McGill
Northern Kentucky University

Michael Mendenhall
University of Kentucky

David Merkler
University of South Florida

Gary Merrill
Oregon State University

Debra Moriarity
University of Alabama, Huntsville

Patricia Moroney
Louisiana State University

M. Kazem Mostafapour
University of Michigan, Dearborn

Duarte Mota de Freitas
Loyola University of Chicago

Stephen Munroe
Marquette University

Xiaping Pan
East Carolina University

Scott Pattison
Ball State University

Stefan Paula
Northern Kentucky University

David Pendergrass
University of Kansas

Reuben Peters
Iowa State University

Wendy Pogozelski
State University of New York, Geneseo

Geraldine Prody
Western Washington University

Greg Raner
University of North Carolina, Greensboro

Joshua Rausch
Elmhurst College

Tanea Reed
Eastern Kentucky University

Lori Robins
California Polytechnic University, San Luis Obispo

Douglas Root
University of North Texas

Theresa Salerno
Minnesota State University, Mankato

Scott Samuels
University of Montana, Missoula

Benjamin Sandler
Oklahoma State University

Joel Schildbach
Johns Hopkins University

Hua Shi
State University of New York, University at Albany

Kerry Smith
Clemson University

Robert Stach
University of Michigan, Flint

Scott Stagg
Florida State University

Wesley Stites
University of Arkansas, Fayetteville

Paul Straight
Texas A&M University

Gerald Stubbs
Vanderbilt University

Takita Felder Sumter
Winthrop University

Jeremy Thorner
University of California, Berkeley

Liang Tong
Columbia University

Kenneth Traxler
Bemidji State University

Peter Van Der Geer
San Diego State University

Nagarajan Vasumathi
Jacksonville State University

Stefan Vetter
Florida Atlantic University

Edward Walker
Weber State University

Xuemin Wang
University of Missouri, St. Louis

Kevin Williams
Western Kentucky University

Warren Williams
University of British Columbia

Shiyong Wu
Ohio University

Laura Zapanta
University of Pittsburgh

Três de nós já tinham usufruído do prazer de trabalhar com a equipe da W. H. Freeman and Company em vários projetos, e nossas experiências sempre foram gratificantes e prazerosas. Escrever e produzir a sétima edição desta obra não foi uma exceção. A equipe da Freeman sabe como realizar projetos estressantes, mas estimulantes, e como reduzir a tensão sem comprometer o entusiasmo. Além disso, são extremamente profissionais e conseguem insistir sem irritar. Precisamos agradecer a muitas pessoas por essa experiência. Primeiramente, reconhecemos o encorajamento, a paciência, os excelentes conselhos e o bom humor da editora Kate Ahr Parker. Seu entusiasmo foi uma fonte de energia para todos nós. Lisa Samols foi uma fantástica editora de desenvolvimento. Seu discernimento, sua paciência e sua compreensão foram fundamentais para esse projeto. Beth Howe e Erica Champion auxiliaram Lisa Samols na elaboração de vários capítulos e somos imensamente gratos a elas por sua ajuda. Georgia Lee Hadler, editora sênior de projeto, controlou o fluxo do projeto como um todo, com sua habitual eficiência. Patrícia Zimmerman e Nancy Brooks, nossas editoras de manuscrito, aprimoraram a consistência literária e a clareza do texto. Vicki Tomaselli, diretora de arte, criou um *design* e um *layout* que aprimoraram esta obra, mas conservaram o vínculo com as edições anteriores. Christine Beuse, editora de fotografia, e Jacalyn Wong, pesquisadora de fotografia, descobriram imagens que tornaram o texto ainda mais interessante. Janice Donnola, coordenadora de ilustração, conduziu com elegância o aprimoramento das novas ilustrações. Paul Rohloff, coordenador de produção, conseguiu superar as significativas dificuldades de programação, composição e criação. Andrea Gawrylewski, Patrick Shriner, Marni Rolfes e Rohit Phillip foram fantásticos na sua abordagem do programa de mídia. Amanda Dunning coordenou, com a habilidade conhecida, o plano de suplementos impressos. Somos gratos também a assistente editorial Anna Bristow. Debbie Clare, diretora associada de marketing, apresentou com muito entusiasmo essa nova edição ao mundo acadêmico. O pessoal do departamento de vendas nos deu um suporte imprescindível. Não temos como expressar nosso reconhecimento por seu entusiasmo. Finalmente, temos um débito imenso para com Elizabeth Widdicombe, Presidente da W. H. Freeman and Company. Sua visão para livros científicos e sua habilidade de reunir pessoas com talentos excepcionais tornaram a interação com a W. H. Freeman and Company um imenso prazer.

Não podemos deixar de mencionar a contribuição dos muitos colegas em nossa instituição, assim como outros em todo o território norte-americano que pacientemente responderam aos nossos questionamentos e nos encorajaram em nosso trabalho. Por fim, temos um tributo a prestar às nossas famílias – nossas esposas, Wendie Berg, Alison Unger e Megan Williams, e nossos filhos, Alex, Corey e Monica Berg, Janina e Nicholas Tymoczko e Timothy e Mark Gatto. Sem o suporte, o conforto e a compreensão deles essa tarefa não poderia ter sido cumprida com sucesso.

Constantes de acidez

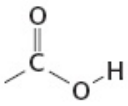
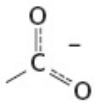
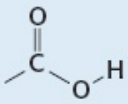
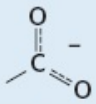
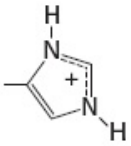
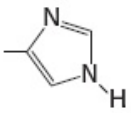
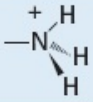
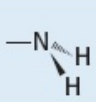
Valores de pK_a de alguns ácidos

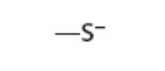
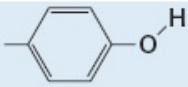
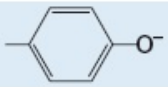
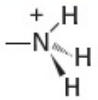
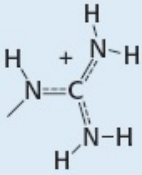
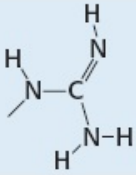
Ácido	pK' (a 25°C)
Ácido acético	4,76
Ácido acetoacético	3,58
Íon amônio	9,25
Ácido ascórbico, pK_1	4,10
pK_2	11,79
Ácido benzoico	4,20
Ácido n-butírico	4,81
Ácido cacodílico	6,19
Ácido cítrico, pK_1	3,14
pK_2	4,77
pK_3	6,39
Íon etilamônio	10,81
Ácido fórmico	3,75
Glicina, pK_1	2,35
pK_2	9,78
Íon imidazólio	6,95
Ácido láctico	3,86
Ácido maleico, pK_1	1,83
pK_2	6,07
Ácido málico, pK_1	3,40
pK_2	5,11
Fenol	9,89
Ácido fosfórico, pK_1	2,12

pK_2	7,21
pK_3	12,67
Íon piridínio	5,25
Ácido pirofosfórico, pK_1	0,85
pK_2	1,49
pK_3	5,77
pK_4	8,22
Ácido succínico, pK_1	4,21
pK_2	5,64
Íon trimetilamônio	9,79
Tris(hidroximetil)aminometano	8,08
Água*	15,74

*$[H^+]\ [OH^-] = 10^{-14}$; $[H_2O] = 55{,}5$ M.

Valores típicos de pK_a de grupamentos ionizáveis nas proteínas

Grupamento	Ácido		Base	pK_a típico
α-carboxil terminal				3,1
Ácido aspártico				4,1
Ácido glutâmico				
Histidina				6,0
α-amino terminal				8,0

Grupamento	Ácido		Base	pK_a típico
Cisteína				8,3
Tirosina				10,4
Lisina				10,0
Arginina				12,5

Nota: os valores de pK_a dependem da temperatura, da força iônica e do microambiente do grupamento ionizável.

Comprimento padrão de ligações

Ligação	Estrutura	Comprimento (Å)
C—H	R_2CH_2	1,07

	Aromática	1,08
	RCH_3	1,10
C—C	Hidrocarboneto	1,54
	Aromática	1,40
C=C	Etileno	1,33
C≡C	Acetileno	1,20
C—N	RNH_2	1,47
	O=C—N	1,34
C—O	Álcool	1,43
	Éster	1,36
C=O	Aldeído	1,22
	Amida	1,24
C—S	R_2S	1,82
N—H	Amida	0,99
O—H	Álcool	0,97
O—O	O_2	1,21
P—O	Éster	1,56
S—H	Tiol	1,33
S—S	Dissulfeto	2,05

Material Suplementar

Este livro conta com o seguinte material suplementar:

- Testes de conhecimentos gerais

O acesso ao material suplementar é gratuito mediante cadastro em: http://gen-io.grupogen.com.br e emprego do código existente na etiqueta colada na primeira capa interna deste livro.

GEN | Informação Online

GEN-IO (GEN | Informação Online) é o repositório de materiais suplementares e de serviços relacionados com livros publicados pelo GEN | Grupo Editorial Nacional, maior conglomerado brasileiro de editoras do ramo científico-técnico-profissional, composto por Guanabara Koogan, Santos, Roca, AC Farmacêutica, Forense, Método, LTC, E.P.U. e Forense Universitária. Os materiais suplementares ficam disponíveis para acesso durante a vigência das edições atuais dos livros a que eles correspondem.

Sumário

Parte 1 Desenho Molecular da Vida

1 Bioquímica | Uma Ciência em Evolução

1.1 A unidade bioquímica é subjacente à diversidade biológica

1.2 O DNA ilustra a relação entre a forma e a função

1.3 Os conceitos da química explicam as propriedades das moléculas biológicas

1.4 A revolução da genômica está transformando a bioquímica e a medicina

2 Estrutura e Composição das Proteínas

2.1 As proteínas são construídas a partir de um repertório de 20 aminoácidos

2.2 Estrutura primária | Os aminoácidos são unidos por ligações peptídicas para formar cadeias polipeptídicas

2.3 Estrutura secundária | As cadeias polipeptídicas podem se enovelar em estruturas regulares como a alfa-hélice, a folha beta, voltas e alças

2.4 Estrutura terciária | As proteínas hidrossolúveis enovelam-se em estruturas compactas com núcleos apolares

2.5 Estrutura quaternária | As cadeias polipeptídicas podem se unir formando estruturas com múltiplas subunidades

2.6 A sequência de aminoácidos de uma proteína determina sua estrutura tridimensional

3 Estudo das Proteínas e dos Proteomas

3.1 A purificação de proteínas é um primeiro passo essencial para a compreensão de suas funções

3.2 As sequências de aminoácidos das proteínas podem ser determinadas experimentalmente

3.3 A imunologia fornece técnicas importantes para a investigação das proteínas

3.4 A espectrometria de massa é uma técnica poderosa para a identificação de peptídios e proteínas

3.5 Proteínas podem ser sintetizadas por métodos automatizados em fase sólida

3.6 A estrutura tridimensional das proteínas pode ser determinada por cristalografia de raios X e espectroscopia de ressonância magnética

4 DNA, RNA e Fluxo da Informação Genética

4.1 Um ácido nucleico consiste em quatro tipos de bases ligadas a um arcabouço de osefosfato

4.2 Um par de cadeias de ácidos nucleicos com sequências complementares pode formar uma estrutura em dupla hélice

4.3 A dupla hélice facilita a transmissão precisa da informação hereditária

4.4 O DNA é replicado por polimerases que recebem instruções de moldes

4.5 A expressão gênica é a transformação da informação do DNA em moléculas funcionais

4.6 Os aminoácidos são codificados por grupos de três bases a partir de um ponto inicial fixo

4.7 A maioria dos genes eucarióticos é um mosaico de íntrons e éxons

5 Estudo dos Genes e Genomas

5.1 A exploração dos genes baseia-se em ferramentas específicas

5.2 A tecnologia do DNA recombinante revolucionou todos os aspectos da biologia

5.3 Genomas completos foram sequenciados e analisados

5.4 Genes eucarióticos podem ser quantificados e manipulados com considerável precisão

6 Estudo da Evolução e da Bioinformática

6.1 Os homólogos são descendentes de um ancestral comum

6.2 A análise estatística do alinhamento de sequências pode detectar a homologia

6.3 O exame da estrutura tridimensional amplia nossa compreensão das relações evolutivas

6.4 Árvores evolutivas podem ser construídas com base nas informações das sequências

6.5 As técnicas modernas disponíveis possibilitam a exploração experimental da evolução

7 Hemoglobina | Retrato de uma Proteína em Ação

7.1 O oxigênio liga-se aos átomos de ferro do heme da mioglobina e hemoglobina

7.2 A hemoglobina liga-se ao oxigênio de modo cooperativo

7.3 Os íons hidrogênio e o dióxido de carbono promovem a liberação de oxigênio | O efeito Bohr

7.4 Mutações nos genes que codificam as subunidades da hemoglobina podem resultar em doença

8 Enzimas | Conceitos Básicos e Cinética

8.1 As enzimas são catalisadores poderosos e altamente específicos

8.2 A energia livre é uma função termodinâmica útil para o entendimento das enzimas

8.3 As enzimas aceleram reações, facilitando a formação do estado de transição

8.4 A equação de Michaelis-Menten descreve as propriedades cinéticas de muitas enzimas

8.5 As enzimas podem ser inibidas por moléculas específicas

8.6 As enzimas podem ser estudadas uma molécula de cada vez

9 Estratégias de Catálise

9.1 As proteases facilitam uma reação fundamentalmente difícil

9.2 As anidrases carbônicas aceleram uma reação rápida

9.3 As enzimas de restrição catalisam reações de clivagem do DNA altamente específicas

9.4 As miosinas aproveitam mudanças conformacionais das enzimas para acoplar a hidrólise do ATP ao trabalho mecânico

10 Estratégias de Regulação

10.1 A aspartato transcarbamilase é inibida alostericamente pelo produto final da sua via

10.2 As isozimas fornecem um meio de regulação específica para diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento

10.3 A modificação covalente constitui um meio de regular a atividade enzimática

10.4 Muitas enzimas são ativadas por clivagem proteolítica específica

11 Carboidratos

11.1 Os monossacarídios são os carboidratos mais simples

11.2 Os monossacarídios estão ligados entre si para formar carboidratos complexos

11.3 Os carboidratos podem ligar-se às proteínas para formar glicoproteínas

11.4 As lectinas são proteínas que ligam carboidratos específicos

12 Lipídios e Membranas Celulares

12.1 Os ácidos graxos são constituintes essenciais dos lipídios

12.2 Existem três tipos comuns de lipídios de membrana

12.3 Os fosfolipídios e os glicolipídios formam prontamente lâminas bimoleculares em meios aquosos

12.4 As proteínas realizam a maior parte dos processos da membrana

12.5 Os lipídios e muitas proteínas de membrana difundem-se rapidamente no plano da membrana

12.6 As células eucarióticas contêm compartimentos delimitados por membranas internas

13 Canais e Bombas de Membranas

13.1 O transporte de moléculas através de uma membrana pode ser ativo ou passivo

13.2 Duas famílias de proteínas de membrana utilizam a hidrólise do ATP para bombear íons e moléculas através das membranas

13.3 Os transportadores secundários utilizam um gradiente de concentração para abastecer o próximo

13.4 Canais específicos podem rapidamente transportar íons através das membranas

13.5 As junções comunicantes (*gap junctions*) possibilitam o fluxo de íons e pequenas moléculas entre células que se comunicam

13.6 Canais específicos aumentam a permeabilidade de algumas membranas à água

14 Vias de Transdução de Sinais

14.1 As proteínas G heterotriméricas transmitem sinais e se restabelecem

14.2 Sinalização da insulina | As cascatas de fosforilação são fundamentais para muitos processos de transdução de sinais

14.3 Sinalização do EGF | As vias de transdução de sinais são preparadas para responder

14.4 Muitos elementos reaparecem com variações em diferentes vias de transdução de sinais

14.5 Defeitos nas vias de transdução de sinais podem levar ao câncer e a outras doenças

Parte 2 Transdução e Armazenamento de Energia

15 Metabolismo | Esboço e Conceitos Básicos

15.1 O metabolismo é composto por muitas reações acopladas e interconectadas

15.2 ATP é a forma universal de energia livre usada pelos sistemas biológicos

15.3 A oxidação de fontes de carbono é um gerador importante de energia celular

15.4 As vias metabólicas contêm muitos padrões (motifs) recorrentes

16 Glicólise e Gliconeogênese

16.1 A glicólise é uma via de conversão de energia em muitos organismos

16.2 A via glicolítica é rigidamente controlada
16.3 A glicose pode ser sintetizada a partir de precursores não carboidrato
16.4 A gliconeogênese e a glicólise são reguladas reciprocamente

17 Ciclo do Ácido Cítrico
17.1 Piruvato desidrogenase conecta a glicólise ao ciclo do ácido cítrico
17.2 O ciclo do ácido cítrico oxida duas unidades de carbono
17.3 A entrada no ciclo do ácido cítrico e o metabolismo por meio dele são controlados
17.4 O ciclo do ácido cítrico é uma fonte de precursores da biossíntese
17.5 O ciclo do glioxilato possibilita que plantas e bactérias cresçam em acetato

18 Fosforilação Oxidativa
18.1 A fosforilação oxidativa nos eucariotos ocorre nas mitocôndrias
18.2 A fosforilação oxidativa depende da transferência de elétrons
18.3 A cadeia respiratória é constituída por quatro complexos: três bombas de prótons e uma ligação física com o ciclo do ácido cítrico
18.4 Um gradiente de prótons impulsiona a síntese de ATP
18.5 Muitos circuitos ou lançadeiras (*shuttles*) possibilitam o movimento através das membranas mitocondriais
18.6 A regulação da respiração celular é dirigida primariamente pela necessidade de ATP

19 Fotorreações da Fotossíntese
19.1 A fotossíntese ocorre nos cloroplastos
19.2 A absorção de luz pela clorofila induz a transferência de elétrons
19.3 Dois fotossistemas geram um gradiente de prótons e NADPH na fotossíntese oxigênica
19.4 Um gradiente de prótons através da membrana tilacoide impulsiona a síntese de ATP
19.5 Pigmentos acessórios direcionam a energia para os centros de reação
19.6 A capacidade de converter a luz em energia química é antiga

20 Ciclo de Calvin e a Via das Pentoses Fosfato
20.1 O ciclo de Calvin sintetiza hexoses a partir do dióxido de carbono e da água
20.2 A atividade do ciclo de Calvin depende das condições ambientais

20.3 A via das pentoses fosfato gera NADPH e sintetiza açúcares de cinco carbonos
20.4 O metabolismo da glicose 6-fosfato pela via das pentoses fosfato é coordenado com a glicólise
20.5 A glicose 6-fosfato desidrogenase desempenha um papel essencial na proteção contra espécies reativas de oxigênio

21 Metabolismo do Glicogênio
21.1 A degradação do glicogênio requer a interação de várias enzimas
21.2 A fosforilase é regulada por interações alostéricas e por fosforilação reversível
21.3 A epinefrina e o glucagon sinalizam a necessidade de degradação do glicogênio
21.4 O glicogênio é sintetizado e degradado por vias diferentes
21.5 A degradação e a síntese de glicogênio são reguladas de modo recíproco

22 Metabolismo dos Ácidos Graxos
22.1 Os triacilgliceróis são reservas de energia altamente concentradas
22.2 A utilização de ácidos graxos como fonte de energia requer três estágios de processamento
22.3 Os ácidos graxos insaturados e de cadeia ímpar exigem etapas adicionais para a sua degradação
22.4 Os ácidos graxos são sintetizados pela ácido graxo sintase
22.5 O alongamento e a insaturação de ácidos graxos são efetuados por sistemas enzimáticos acessórios
22.6 A acetil-CoA carboxilase desempenha um papel essencial no controle do metabolismo dos ácidos graxos

23 Renovação das Proteínas e Catabolismo dos Aminoácidos
23.1 As proteínas são degradadas a aminoácidos
23.2 A renovação das proteínas é rigorosamente regulada
23.3 A primeira etapa na degradação dos aminoácidos consiste na remoção do nitrogênio
23.4 O íon amônio é convertido em ureia na maioria dos vertebrados terrestres
23.5 Os átomos de carbono dos aminoácidos degradados emergem como intermediários metabólicos importantes
23.6 Os erros inatos do metabolismo podem comprometer a degradação dos aminoácidos

Parte 3 Síntese das Moléculas da Vida

24 Biossíntese de Aminoácidos

24.1 Fixação do nitrogênio | Os microrganismos utilizam ATP e um poderoso redutor para reduzir o nitrogênio atmosférico a amônia

24.2 Os aminoácidos são produzidos a partir de intermediários do ciclo do ácido cítrico e de outras vias importantes

24.3 A biossíntese de aminoácidos é regulada por inibição por retroalimentação

24.4 Os aminoácidos são precursores de muitas biomoléculas

25 Biossíntese de Nucleotídios

25.1 O anel pirimidínico é montado *de novo* ou recuperado por vias de recuperação

25.2 As bases purínicas podem ser sintetizadas *de novo* ou recicladas por vias de recuperação

25.3 Os desoxirribonucleotídios são sintetizados pela redução de ribonucleotídios por meio de um mecanismo de formação de radicais livres

25.4 As etapas essenciais na biossíntese de nucleotídios são reguladas por inibição por retroalimentação

25.5 Os distúrbios no metabolismo de nucleotídios podem causar condições patológicas

26 Biossíntese dos Lipídios e Esteroides da Membrana

26.1 O fosfatidato é um intermediário comum na síntese dos fosfolipídios e triacilgliceróis

26.2 O colesterol é sintetizado a partir da acetilcoenzima A em três estágios

26.3 A regulação complexa da biossíntese de colesterol ocorre em vários níveis

26.4 Os derivados importantes do colesterol incluem sais biliares e hormônios esteroides

27 Integração do Metabolismo

27.1 A homeostasia calórica constitui um meio de regular o peso corporal

27.2 O cérebro desempenha um papel essencial na homeostasia calórica

27.3 O diabetes é uma doença metabólica comum, que frequentemente resulta da obesidade

27.4 O exercício físico altera beneficamente a bioquímica das células

27.5 A ingestão de alimentos e a inanição induzem alterações metabólicas

27.6 O etanol altera o metabolismo energético no fígado

28 Replicação, Reparo e Recombinação do DNA

28.1 A replicação do DNA ocorre pela polimerização de trifosfatos de desoxirribonucleosídios ao longo de um molde

28.2 O desenrolamento e o superespiralamento do DNA são controlados por topoisomerases

28.3 A replicação do DNA é altamente coordenada

28.4 Muitos tipos de dano ao DNA podem ser reparados

28.5 A recombinação do DNA desempenha papéis importantes na replicação, no reparo e em outros processos

29 Síntese e Processamento do RNA

29.1 As RNA polimerases catalisam a transcrição

29.2 A transcrição nos eucariotos é altamente regulada

29.3 Os produtos de transcrição das polimerases eucarióticas são processados

29.4 A descoberta do RNA catalítico foi reveladora em relação ao mecanismo e à evolução

30 Síntese de Proteínas

30.1 A síntese de proteínas requer a tradução de sequências de nucleotídios em sequências de aminoácidos

30.2 As aminoacil-RNA transportador sintetases fazem a leitura do código genético

30.3 O ribossomo constitui o local de síntese de proteínas

30.4 A síntese de proteínas pelos eucariotos difere da síntese procariótica basicamente no início da tradução

30.5 Vários antibióticos e toxinas podem inibir a síntese de proteínas

30.6 Os ribossomos ligados ao retículo endoplasmático fabricam proteínas secretoras e de membrana

31 Controle da Expressão Gênica nos Procariotos

31.1 Muitas proteínas que se ligam ao DNA reconhecem sequências específicas do DNA

31.2 As proteínas procarióticas que se ligam ao DNA conectam-se especificamente a sítios reguladores em óperons

31.3 Circuitos reguladores podem resultar em permuta entre os padrões de expressão gênica

31.4 A expressão gênica pode ser controlada em nível pós-transcricional

32 Controle da Expressão Gênica em Eucariotos

32.1 DNA eucariótico é organizado em cromatina
32.2 Fatores de transcrição ligam-se ao DNA e regulam o início da transcrição
32.3 O controle da expressão gênica pode exigir remodelagem da cromatina
32.4 A expressão gênica eucariótica pode ser controlada em níveis pós-transcricionais

Parte 4 Reação a Alterações Ambientais

33 Sistemas Sensoriais
33.1 Uma ampla variedade de compostos orgânicos é detectada pela olfação
33.2 O paladar é uma combinação de sentidos que funcionam por mecanismos diferentes
33.3 As moléculas fotorreceptoras nos olhos detectam a luz visível
33.4 A audição depende da detecção rápida de estímulos mecânicos
33.5 O tato inclui a percepção de pressão, temperatura e outros fatores

34 Sistema Imunológico
34.1 Os anticorpos são constituídos de unidades distintas de ligação de antígeno e efetoras
34.2 Os anticorpos ligam-se a moléculas específicas por meio de alças hipervariáveis
34.3 A diversidade é gerada por rearranjos gênicos
34.4 As proteínas do complexo principal de histocompatibilidade apresentam antígenos peptídicos na superfície celular para reconhecimento pelos receptores de células T
34.5 O sistema imunológico contribui para a prevenção e o desenvolvimento de doenças humanas

35 Motores Moleculares
35.1 As proteínas motoras moleculares são, em sua maioria, membros da superfamília de NTPase com alça P
35.2 As moléculas de miosina movem-se ao longo de filamentos de actina
35.3 A cinesina e a dineína movem-se ao longo de microtúbulos
35.4 Um motor giratório impulsiona o movimento bacteriano

36 Desenvolvimento de Fármacos
36.1 O desenvolvimento de fármacos é um imenso desafio
36.2 Os candidatos a fármacos podem ser descobertos ao acaso, por triagem ou planejamento

36.3 As análises dos genomas são promissoras para a descoberta de fármacos
36.4 O desenvolvimento de fármacos ocorre em vários estágios

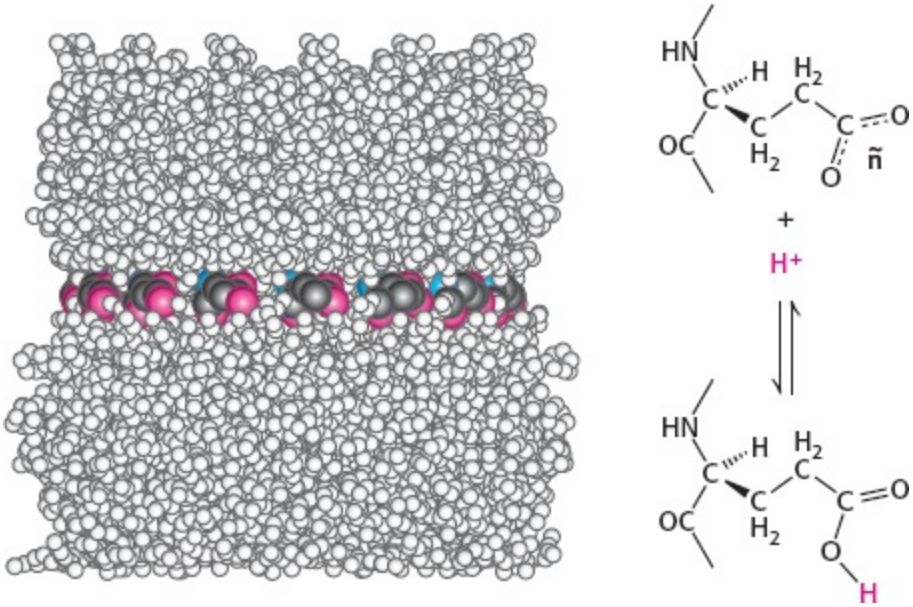
Respostas

Leitura Sugerida

Índice Alfabético

Parte 1

Desenho Molecular da Vida



A química em ação. As atividades exercidas por seres humanos demandam energia. A interconversão das diferentes formas de energia requerem grandes sistemas de máquinas bioquímicas, constituídas de milhares de átomos, como o complexo mostrado acima. Entretanto, as funções destes módulos elaborados dependem de processos químicos simples, como a protonação e desprotonação de grupos de ácidos carboxílicos mostrados acima à direita. A fotografia é dos vencedores do prêmio Nobel Peter Agre, M.D. e Carol Greider, Ph.D., os quais usaram técnicas bioquímicas para estudar a estrutura e a função de proteínas. (Cortesia de Johns Hopkins Medicine.)

SUMÁRIO

1.1 A unidade bioquímica é subjacente à diversidade biológica

1.2 O DNA ilustra a relação entre a forma e a função

1.3 Os conceitos da química explicam as propriedades das moléculas biológicas

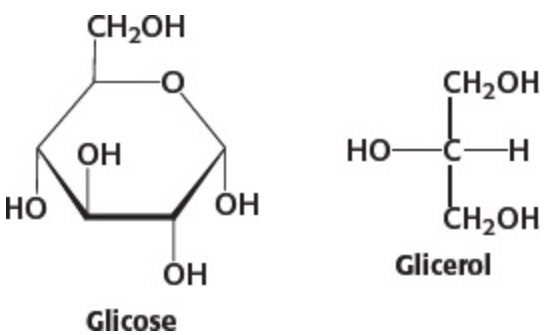
1.4 A revolução da genômica está transformando a bioquímica e a medicina

Bioquímica é o estudo da química dos processos da vida. Desde 1928, quando a descoberta de que moléculas biológicas como a ureia podem ser sintetizadas a partir de componentes não vivos, cientistas têm investigado intensamente a química da vida. Por meio dessas pesquisas, muitos dos mistérios fundamentais sobre o funcionamento dos organismos vivos, em nível bioquímico, foram desvendados. No entanto, ainda há muito a ser estudado. Como de hábito, cada descoberta levanta no mínimo tantas questões quanto respostas. Além disso, estamos agora em uma era de oportunidades sem precedentes para a aplicação de nosso vasto conhecimento sobre bioquímica aos problemas da medicina, odontologia, agricultura, medicina legal, antropologia, ciências ambientais e muitas outras áreas. Iniciamos a nossa viagem pela bioquímica com uma das mais espantosas descobertas do século passado: a unidade principal de todos os seres vivos em nível bioquímico.

1.1 A unidade bioquímica é subjacente à diversidade biológica

O mundo biológico é magnificamente diverso. O reino animal é rico em espécies, variando de insetos quase microscópicos aos elefantes e baleias. O reino vegetal inclui desde espécies tão pequenas e relativamente simples como as algas até espécies grandes e complexas como as sequoias-gigantes. Esta diversidade se estende ainda mais quando nos aproximamos do mundo microscópico. Organismos unicelulares como protozoários, fungos e bactérias estão presentes com grande diversidade na água, no solo e em organismos maiores. Alguns organismos podem sobreviver e eventualmente prosperar em ambientes aparentemente hostis como fontes termais e geleiras.

O desenvolvimento do microscópio revelou uma característica-chave e unificadora subjacente a esta diversidade. Grandes organismos são feitos de *células*, assemelhando-se, até certo ponto, aos organismos unicelulares. A construção de animais, plantas e microrganismos a partir de células sugere que estes organismos diversos podem ter mais em comum do que sua aparência externa sugere. Com o desenvolvimento da bioquímica, esta sugestão foi consideravelmente fundamentada e expandida. No nível bioquímico, todos os organismos têm muitas características em comum (Figura 1.1).



Como mencionado anteriormente, a bioquímica é o estudo da química dos processos vitais. Estes

processos envolvem a interação de duas classes diferentes de moléculas: grandes moléculas, como proteínas e ácidos nucleicos, referidos como *macromoléculas biológicas*, e moléculas de baixo peso molecular, como glicose e glicerol, referidos como *metabólitos*, que são quimicamente transformados nos processos biológicos. Os membros de ambas destas classes de moléculas são comuns, com variações mínimas, a todos os seres vivos. Por exemplo, o *ácido desoxirribonucleico* (DNA) armazena a informação genética em todos os organismos celulares. As *proteínas*, macromoléculas que são as participantes-chave na maioria dos processos biológicos, são feitas pelo mesmo conjunto de 20 unidades estruturais em todos os organismos. Além disso, as proteínas que têm funções similares em organismos diferentes em geral têm estruturas tridimensionais muito similares (Figura 1.1).

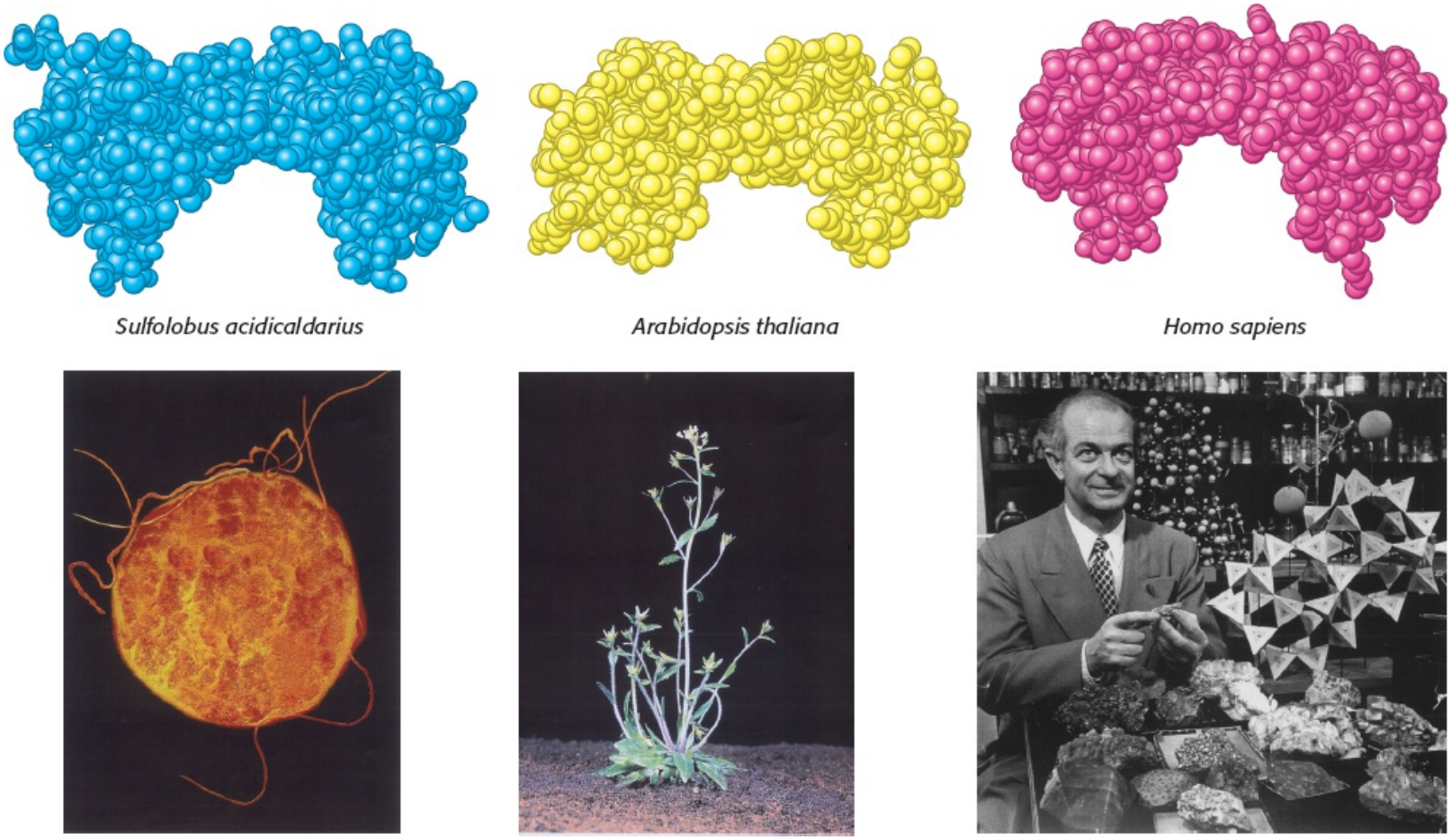


Figura 1.1 Diversidade e semelhança biológica. A forma de uma molécula-chave na regulação gênica (a proteína de ligação ao TATA-box) é semelhante em três organismos consideravelmente diferentes que estão separados um do outro por bilhões de anos de evolução. [(Esquerda) Dr. T. J. Beveridge/Visuals Unlimited; (meio) Holt Studios/Photo Researchers; (direita) Time Life Pictures/Getty Images.]

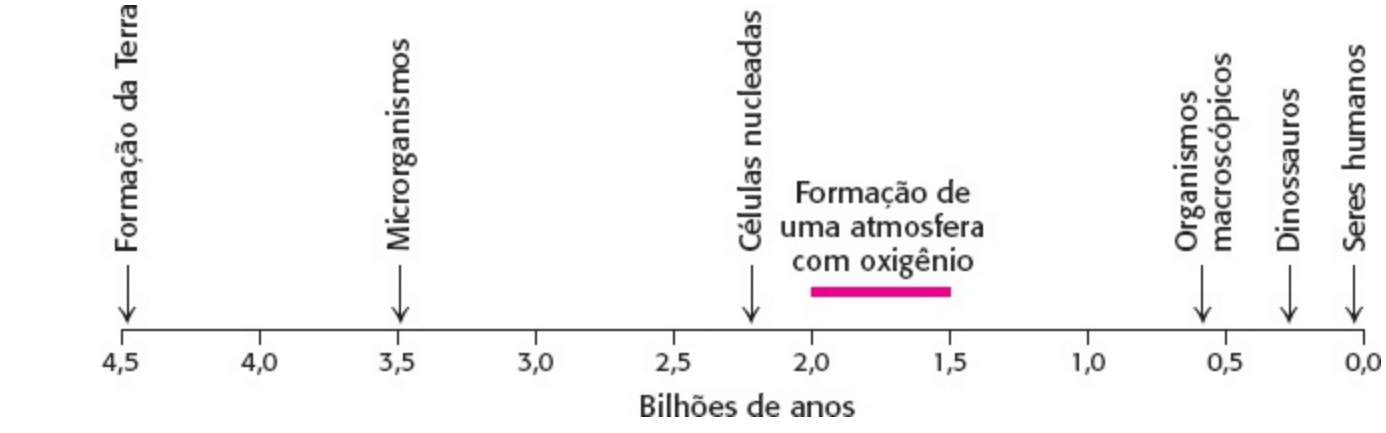


Figura 1.2 Uma provável linha temporal para a evolução bioquímica. Eventos-chave estão indicados. Observe que a vida na Terra começou aproximadamente há 3,5 bilhões de anos, enquanto os seres humanos apareceram bem recentemente.

Os processos biológicos fundamentais também são comuns a muitos organismos. Por exemplo, o conjunto de transformações químicas que converte a glicose e o oxigênio em dióxido de carbono e água é essencialmente idêntico em bactérias simples como a *Escherichia coli (E. coli)* e em seres humanos. Mesmo processos que aparentam ser bem diferentes geralmente têm características comuns no nível bioquímico. Notavelmente, os processos bioquímicos pelos quais as plantas capturam a energia luminosa e a convertem em formas mais utilizáveis são consideravelmente similares às etapas utilizadas pelos animais para captar a energia liberada pela degradação da glicose.

Estas observações sugerem veementemente que todos os seres vivos têm um ancestral comum e que os organismos modernos evoluíram deste ancestral até suas formas atuais. Evidências geológicas e bioquímicas dão suporte à linha temporal desta via evolutiva (Figura 1.2). Com base em suas características bioquímicas, os diferentes organismos do mundo moderno podem ser divididos em três grupos fundamentais chamados de *domínios: Eukaria* (eucariontes), *Bacteria* e *Archaea*. Os eucariontes compreendem todos os organismos multicelulares, incluindo os seres humanos e muitos organismos microscópicos unicelulares, como as leveduras. A característica que define os eucariontes é a presença de um núcleo bem definido dentro de cada célula. Organismos unicelulares como as bactérias, que não têm núcleo, são chamados de *procariontes.* Os procariontes foram reclassificados como dois domínios diferentes em resposta à descoberta de Carl Woese, em 1977, de que certos organismos similares às bactérias são bioquimicamente diferentes de outras espécies de bactérias anteriormente caracterizadas. Tais organismos, hoje sabemos, divergiram evolutivamente das bactérias e são conhecidos como *Archaea.* As vias evolutivas do ancestral comum aos organismos modernos podem ser deduzidas por meio de informações bioquímicas. Uma destas vias é mostrada na Figura 1.3.

Grande parte deste livro investigará as reações químicas, as macromoléculas biológicas e os metabólitos que são encontrados em processos biológicos comuns a todos os organismos. A unidade da vida no nível bioquímico torna esta abordagem possível. Ao mesmo tempo, organismos diferentes têm necessidades específicas, de acordo com o nicho biológico no qual evoluíram e vivem. Comparando e contrastando os detalhes das vias bioquímicas específicas em organismos diferentes, poderemos aprender como os desafios biológicos são solucionados no nível bioquímico. Na maioria dos casos, tais desafios são abordados pela adaptação de macromoléculas existentes às novas demandas, em vez da evolução de novas macromoléculas.

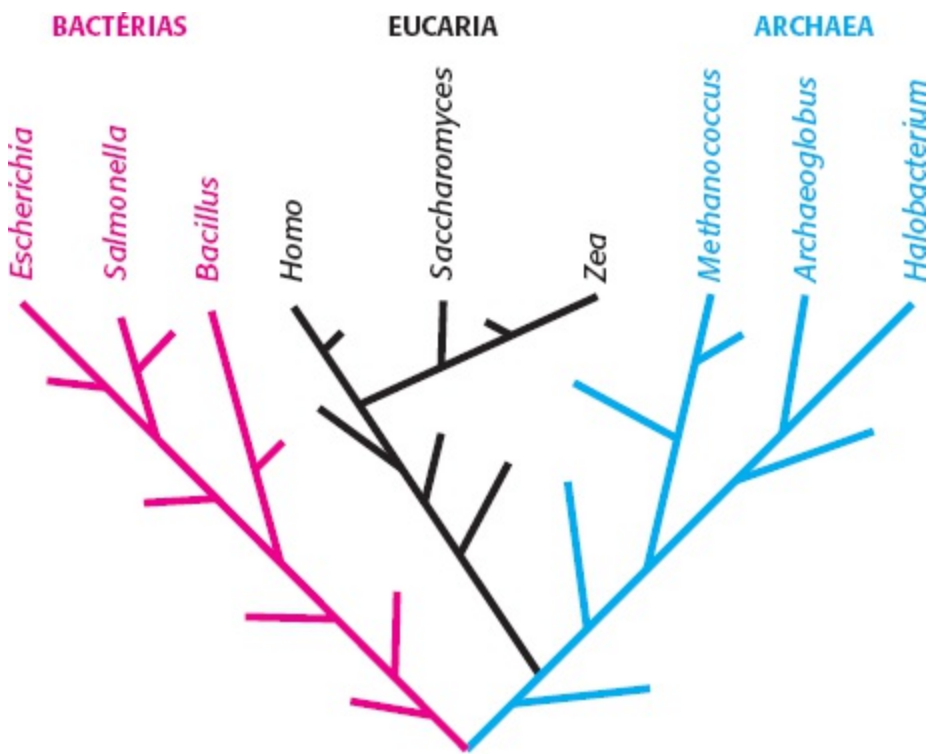


Figura 1.3 A árvore da vida. Uma possível via evolutiva proveniente de um ancestral comum há aproximadamente 3,5 bilhões de anos, na base da árvore, aos organismos do mundo moderno, no topo.

A bioquímica foi muito enriquecida pela nossa capacidade de examinar as estruturas tridimensionais das macromoléculas biológicas em grande detalhe. Algumas destas estruturas são simples e elegantes, enquanto outras são incrivelmente complicadas. De qualquer modo, estas estruturas fornecem o arcabouço essencial para a compreensão de suas funções. Começamos nossa investigação da relação entre a estrutura e a função com o material genético, o DNA.

1.2 O DNA ilustra a relação entre a forma e a função

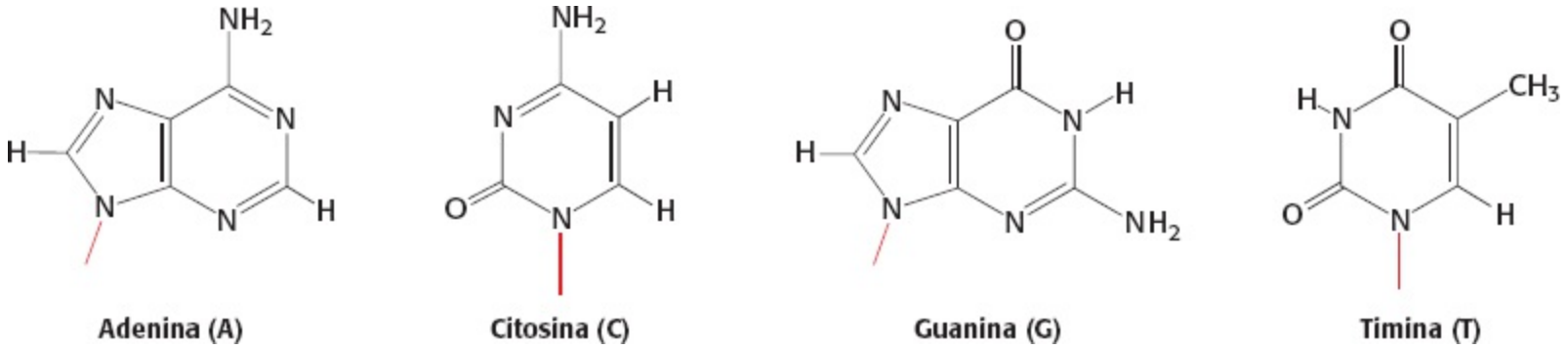
Uma característica fundamental comum a todos os organismos celulares é o uso do DNA para armazenar a informação genética. A descoberta de que o DNA tem este papel central foi feita inicialmente em estudos com bactérias na década de 1940. Tal descoberta foi seguida da elucidação da estrutura tridimensional do DNA em 1953, um evento que estabeleceu as bases para muitos dos avanços na bioquímica e em muitos outros campos, até os dias de hoje.

A estrutura do DNA ilustra claramente o princípio básico comum a todas as macromoléculas biológicas: a relação íntima entre a estrutura e a função. As notáveis propriedades deste composto químico permitem que ele funcione como um veículo eficiente e robusto para o armazenamento de informação. Podemos começar examinando a estrutura covalente do DNA e seu desdobramento em três dimensões.

O DNA é construído a partir de quatro blocos estruturais

O DNA é um *polímero linear* constituído por quatro tipos de monômeros diferentes. Ele tem um arcabouço central fixo, do qual emergem substituintes variáveis (Figura 1.4). O arcabouço central é feito por unidades repetidas de açúcar (ose) e fosfato. As oses são moléculas de desoxirribose, da

qual o DNA recebe seu nome. Cada desoxirribose conecta-se a dois fosfatos por ligações diferentes. Além disso, cada ose se orienta da mesma maneira, dando direcionalidade a cada fita do DNA, podendo-se discernir uma extremidade da outra. A cada ose pode se unir uma de quatro bases: adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T).



Essas bases se conectam às oses no arcabouço do DNA por meio de ligações mostradas em preto na Figura 1.4. Todas as quatro bases são planares, mas diferem significativamente em outros aspectos. Assim, cada monômero de DNA consiste em uma unidade ose-fosfato e uma das quatro bases ligadas à ose. Estas bases podem se organizar em qualquer ordem ao longo da fita de DNA.

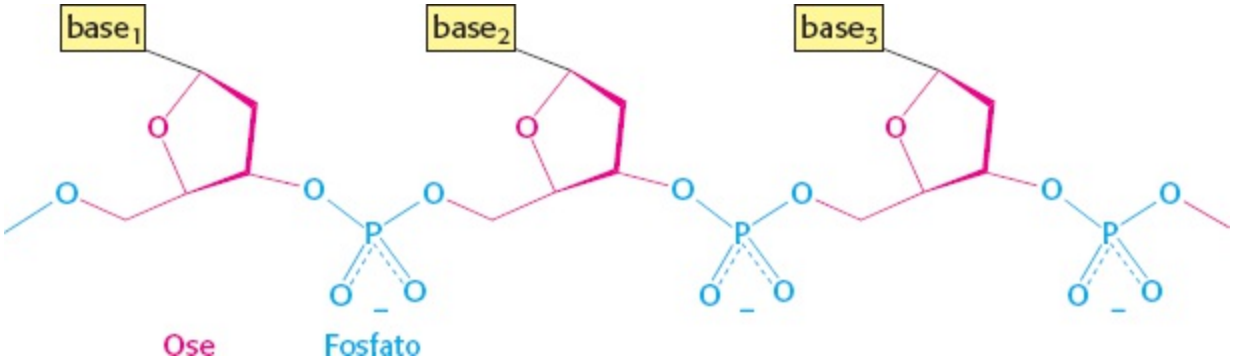


Figura 1.4 Estrutura covalente do DNA. Cada unidade da estrutura do polímero é composta por uma ose (desoxirribose), um fosfato e uma base variável que se projeta do arcabouço de ose-fosfato.

Figura 1.5 Dupla hélice. A estrutura em dupla hélice do DNA, proposta por Watson e Crick. O arcabouço de ose-fosfato das duas cadeias é mostrado em vermelho e azul e as bases, em verde, violeta, laranja e amarelo. As duas fitas são antiparalelas, dispostas em direções opostas em relação ao eixo da dupla hélice, como indicado pelas setas.

Duas fitas de DNA combinam-se para formar uma dupla hélice

A maior parte das moléculas de DNA é constituída por duas fitas, e não uma (Figura 1.5). Em 1953, James Watson e Francis Crick deduziram a organização destas fitas e propuseram a estrutura tridimensional das moléculas de DNA. Tal estrutura é uma dupla hélice composta por duas fitas entrelaçadas dispostas de modo que o arcabouço de ose-fosfato se localiza externamente e as bases,

internamente. A chave para esta estrutura encontra-se nas bases, que formam *pares específicos* de bases (pb), unidos por *pontes de hidrogênio* (Seção 1.3): adenina pareia com timina (A-T) e guanina pareia com citosina (G-C), como mostrado na Figura 1.6. Pontes de hidrogênio são muito mais fracas que as *ligações covalentes* como as ligações carbono-carbono ou carbono-nitrogênio, que definem a estrutura interna das bases. Tais ligações fracas são cruciais para os sistemas bioquímicos; elas são fracas o suficiente para serem reversíveis em processos bioquímicos, ainda que fortes o suficiente, quando numerosas e simultâneas, para auxiliar na estabilização de estruturas específicas como a dupla hélice.

A estrutura do DNA explica a hereditariedade e o armazenamento da informação

A estrutura proposta por Watson e Crick tem duas propriedades de importância central no papel do DNA como o material da hereditariedade. Primeiramente, a estrutura é compatível com qualquer sequência de bases. Os pares de base têm essencialmente a mesma forma (Figura 1.6) e assim se adequam bem ao centro da estrutura em dupla hélice em qualquer sequência. Sem qualquer restrição, a sequência de bases ao longo de uma fita de DNA pode servir como um meio eficiente para o armazenamento de informação. De fato, a sequência de bases ao longo das fitas de DNA é como a informação genética é armazenada. A sequência do DNA determina as sequências do ácido ribonucleico (RNA) e das moléculas de proteínas que desempenham a maior parte das atividades dentro das células.

A segunda propriedade é que, por causa do pareamento, a sequência de bases ao longo de uma fita determina completamente a sequência ao longo da outra. Como Watson e Crick tão despretensiosamente descreveram: "Não nos fugiu à atenção que o pareamento específico que postulamos imediatamente sugere um possível mecanismo de cópia do material genético". Assim, se a dupla hélice de DNA é separada em duas fitas únicas, cada fita pode servir como modelo para a geração da sua fita complementar por meio da formação dos pares de base (Figura 1.7). A estrutura tridimensional do DNA graciosamente ilustra a conexão íntima entre estrutura molecular e função.

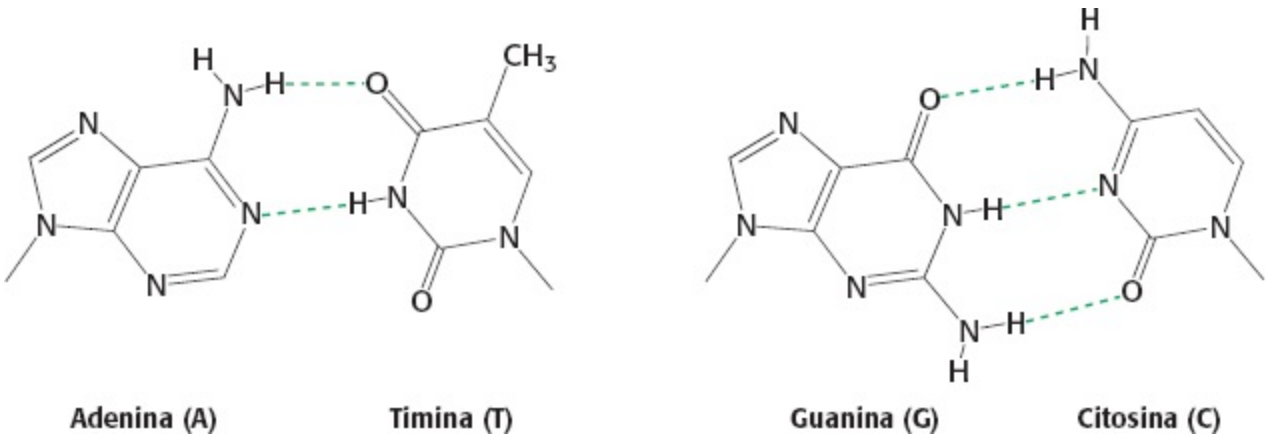


Figura 1.6 Pares de base de Watson e Crick. A adenina pareia com a timina (A-T) e a guanina, com a citosina (G-C). As linhas tracejadas em verde representam as pontes de hidrogênio.

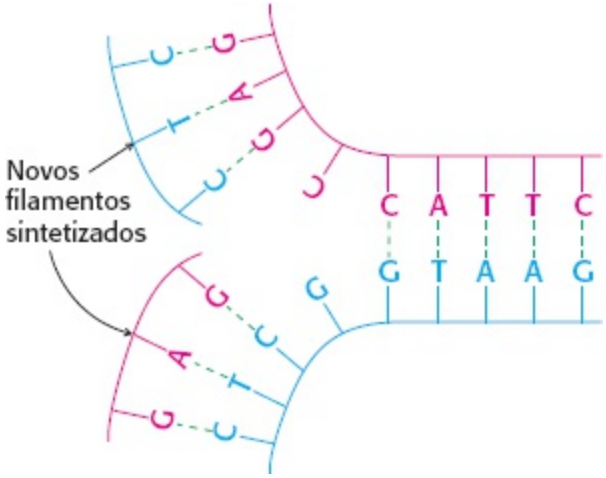


Figura 1.7 Replicação do DNA. Se a molécula de DNA for separada em duas, cada fita pode atuar como molde para a produção de sua fita complementar.

1.3 Os conceitos da química explicam as propriedades das moléculas biológicas

Já vimos como o conhecimento de química, sobre a capacidade das bases do DNA de formarem pontes de hidrogênio, aprofundou a compreensão de um processo biológico fundamental. A fim de estabelecer as bases para o restante do livro, começaremos a estudar a bioquímica examinando conceitos selecionados da química e mostrando como tais conceitos se aplicam aos sistemas biológicos. Tais conceitos incluem os tipos de ligações químicas; a estrutura da água, o solvente no qual a maior parte dos processos biológicos ocorre; a primeira e a segunda leis da termodinâmica; e os princípios da química de ácido-base. Usaremos estes conceitos para examinar o processo bioquímico arquetípico – a formação da dupla hélice de DNA a partir de duas fitas simples. Este processo é um dos muitos exemplos que poderiam ter sido escolhidos para ilustrar tais tópicos. Tenha em mente que, apesar de discussão específica ser sobre o DNA e a formação da dupla hélice, os conceitos considerados são bem gerais e serão aplicados a muitas outras classes de moléculas e processos que serão discutidos no restante do livro.

A dupla hélice pode ser formada a partir das fitas que a compõem

A descoberta de que o DNA proveniente de fontes naturais existe em forma de dupla hélice, com o pareamento de bases de Watson e Crick sugeriram, mas não provaram, que tais duplas hélices se formariam espontaneamente fora de sistemas biológicos. Suponha que duas fitas curtas de DNA foram quimicamente sintetizados para terem sequências complementares de forma que pudessem, em princípio, formar uma dupla hélice com os pares de base de Watson e Crick. Estas duas sequências são CGATTAAT e ATTAATCG. As estruturas destas moléculas em solução podem ser examinadas por uma variedade de técnicas. Isoladamente, cada sequência existe quase exclusivamente como uma molécula de fita única. No entanto, quando as duas sequências são misturadas, a dupla hélice com os pares de base de Watson e Crick se formam (Figura 1.8). Esta reação prossegue até quase se completar.

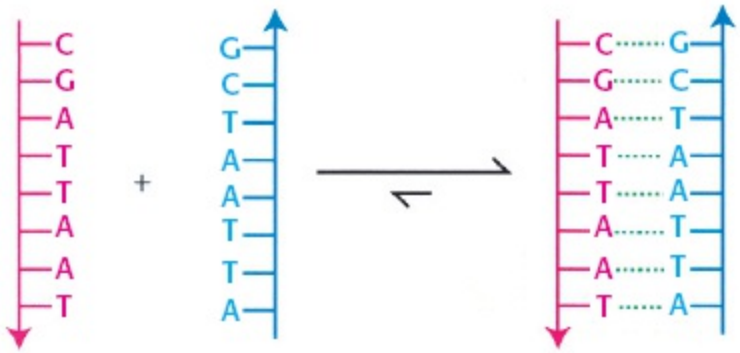


Figura 1.8 Formação da dupla hélice. Quando duas fitas de DNA, com sequências complementares, são misturadas, elas se reúnem espontaneamente para formar uma dupla hélice.

Quais forças impelem as duas fitas de DNA a se ligarem uma á outra? Para analisar esta reação de ligação, devemos considerar vários fatores: os tipos de interações e ligações em sistemas bioquímicos e o balanço energético da reação. Devemos considerar também a influência das condições das soluções – em particular, as consequências das reações ácido-base.

Ligações covalentes e não covalentes são importantes para a estrutura e a estabilidade das moléculas biológicas

Os átomos interagem uns com os outros por ligações químicas. Estas ligações incluem as ligações covalentes que definem a estrutura das moléculas, assim como uma variedade de ligações não covalentes que têm grande importância para a bioquímica.

Unidades de distância e energia

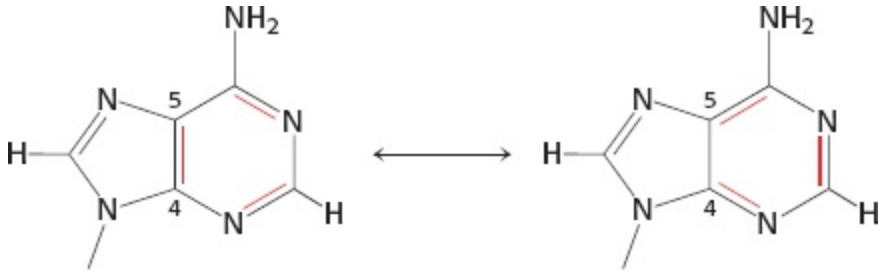
Distâncias interatômicas e comprimentos de ligações são normalmente medidos em unidades de Angstrons (Å):

$1\ Å = 10^{-10}\ m = 10^{-8}\ cm = 0{,}1\ nm$

Diversas unidades de energia são comumente utilizadas. Um joule (J) é a quantidade de energia necessária para mover um metro contra uma força de um newton. Um quilojoule (kJ) é igual a 1.000 joules. Uma caloria é a quantidade de energia necessária para aumentar a temperatura de um grama de água em um grau Celsius. Uma quilocaloria (kcal) é igual a 1.000 calorias. Um joule é igual a 0,239 joules.

Ligações covalentes. As ligações mais fortes são as ligações covalentes, como as ligações que mantêm os átomos juntos dentro das bases individuais mostradas anteriormente. Uma ligação covalente é formada pelo compartilhamento de um par de elétrons entre átomos adjacentes. Uma ligação covalente típica carbono-carbono (C—C) tem um comprimento de 1,54 Å e uma energia de ligação de 355 kJ mol^{-1} (85 kcal mol^{-1}). Como as ligações covalentes são muito fortes, uma energia considerável deve ser despendida para quebrá-las. Mais de um par de elétrons pode ser compartilhado entre dois átomos para formar uma ligação covalente múltipla. Por exemplo, três das bases da Figura 1.6 incluem as ligações duplas carbono-oxigênio (C=O). Tais ligações são ainda mais fortes que as ligações C—C, com energias de ligação de aproximadamente 730 kJ mol^{-1} (175 kcal mol^{-1}) e são um pouco mais curtas.

Para algumas moléculas, mais de um padrão de ligação covalente pode ser representado. Por exemplo, as ligações da adenina podem ser representadas de duas maneiras equivalentes chamadas *estruturas de ressonância*.

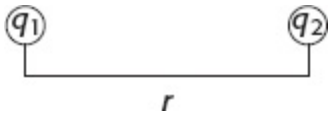


Essas estruturas da adenina retratam disposições alternativas de ligações simples e duplas que são possíveis dentro de um mesmo arcabouço estrutural. As estruturas de ressonância estão mostradas conectadas por uma flecha com duas pontas. A estrutura verdadeira da adenina é composta de suas duas estruturas de ressonância. A estrutura composta manifesta-se por meio do comprimento das ligações, como a ligação que une os carbonos C-4 e C-5. O comprimento observado de 1,40 Å está entre o esperado para uma ligação simples entre C–C (1,54 Å) e o de uma ligação dupla C=C (1,34 Å). Uma molécula que pode ser representada com várias estruturas de ressonância de energias aproximadamente iguais tem maior estabilidade do que uma molécula sem estruturas múltiplas de ressonância.

Ligações não covalentes. Ligações não covalentes são mais fracas do que ligações covalentes, mas são cruciais para os processos bioquímicos como a formação da dupla hélice. Quatro tipos fundamentais de ligações não covalentes são as *interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, interações de van der Waals* e *interações hidrofóbicas.* Elas diferem em geometria, força e especificidade. Além disso, estas ligações são afetadas de formas consideravelmente diferentes pela presença de água. Consideraremos as características de cada tipo:

1. *Interações eletrostáticas.* Um grupo carregado de uma molécula pode atrair um grupo com carga oposta em outra molécula. A energia de uma interação eletrostática é dada pela *lei de Coulomb:*

$$E = kq_1q_2/Dr$$



Em que E é a energia, q_1 e q_{2s} ão as cargas nos dois átomos (em unidades de carga eletrônica), r é a distância entre os dois átomos (em angstroms), D é a constante dielétrica (que leva em consideração os efeitos do meio interveniente) e k é a constante de proporcionalidade (k = 1.389, para unidades de energia em quilojoules por mol ou 332 para energias em quilocalorias por mole).

Por convenção, uma interação de atração tem energia negativa. A interação eletrostática entre dois íons com cargas unitárias opostas separados por 3 Å em água (que tem uma constante dielétrica de 80) tem a energia de –5,8 kJ mol^{-1} (–1,4 kcal mol^{-1}). Observe como é importante a constante dielétrica do meio: para os mesmos íons, separados por 3 Å, em um solvente polar como o hexano (que tem uma constante dielétrica de 2), a energia da interação é de –232 kJ mol^{-1} (–55 kcal mol^{-1}).

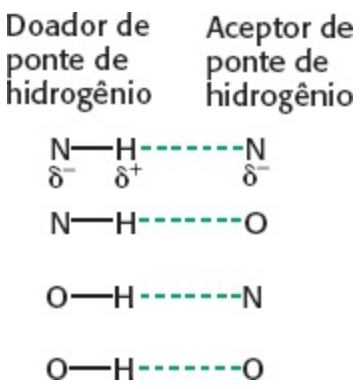


Figura 1.9 Pontes de hidrogênio. As pontes de hidrogênio são mostradas por linhas tracejadas verdes. As posições das cargas parciais (δ^+ e δ^-) também são mostradas.

2. *Pontes de hidrogênio.* Estas interações são fundamentalmente interações eletrostáticas. As pontes de hidrogênio são responsáveis pelo pareamento de bases específico na dupla hélice de DNA. O átomo de hidrogênio em uma ponte de hidrogênio é parcialmente compartilhado por dois átomos eletronegativos como o nitrogênio e o oxigênio. O *doador de ponte de hidrogênio* é o grupo que inclui tanto o átomo ao qual o hidrogênio se liga mais fortemente quanto o próprio hidrogênio, enquanto o *aceptor de ponte de hidrogênio* é o átomo ligado mais fracamente ao átomo de hidrogênio (Figura 1.9). O átomo eletronegativo ao qual o átomo de hidrogênio está ligado covalentemente afasta o elétron do hidrogênio, que "ganha" uma carga parcial positiva (δ^+). Deste modo, o átomo de hidrogênio pode interagir com um átomo que possua uma carga parcial negativa (δ^-) por meio de uma interação eletrostática.

As pontes de hidrogênio são muito mais fracas que as ligações covalentes. Elas têm a energia variando entre 4 e 20 kJ mol^{-1} (de 1 a 5 kcal mol^{-1}). As pontes de hidrogênio são um pouco maiores que as ligações covalentes; a distância de suas ligações (medida a partir do átomo de hidrogênio) varia entre 1,5 Å e 2,6 Å; logo, uma distância que varia entre 2,4 Å e 3,5 Å separa os átomos não hidrogênio, em uma ponte de hidrogênio. As pontes de hidrogênio mais fortes tendem a ser retas, de modo que a ligação entre o doador da ponte de hidrogênio, o átomo de hidrogênio e o aceptor de ponte encontra-se ao longo de uma linha reta. As pontes de hidrogênio são responsáveis por muitas das propriedades que fazem da água um solvente tão especial, como será descrito.

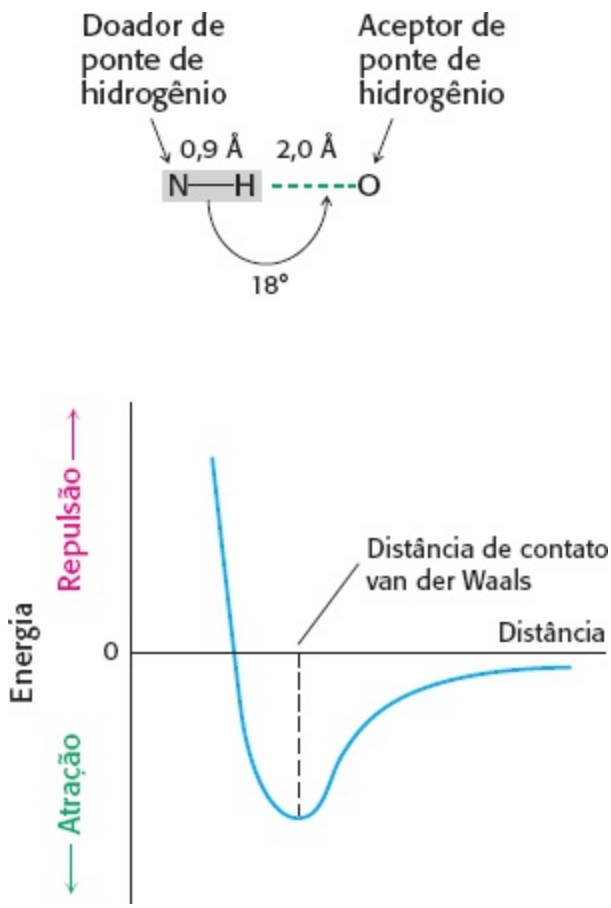
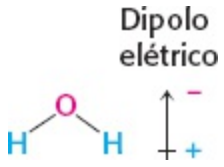


Figura 1.10 Energia de uma interação van der Waals à medida que dois átomos se aproximam. A energia é mais favorável na distância de contato de van der Waals. Em razão da repulsão elétron-elétron, a energia aumenta rapidamente à medida que a distância entre os átomos se torna menor que a distância de contato.

3. *Interações de van der Waals*. A base das interações de van der Waals é que a distribuição da carga eletrônica ao redor de um átomo flutua com o tempo: a qualquer instante, a distribuição da carga não é perfeitamente simétrica. A assimetria transitória na carga elétrica em torno de um átomo atua por meio de interações eletrostáticas de forma a induzir uma assimetria complementar na distribuição dos elétrons dos átomos vizinhos. O átomo e seus vizinhos então se atraem mutuamente. Tal atração aumenta à medida que dois átomos se aproximam um do outro, até que estejam separados pela *distância de contato* van der Waals (Figura 1.10). Em distâncias menores que a distância de contato van der Waals, forças de repulsão muito fortes tornam-se dominantes em razão da superposição das nuvens eletrônicas dos dois átomos.

As energias associadas às interações van de Waals são bem pequenas; as interações típicas têm de 2 a 4 kJ mol^{-1} (de 0,5 a 1 kcal mol^{-1}) por par de átomos. Quando as superfícies de duas moléculas grandes se aproximam, no entanto, um grande número de átomos estabelece o contato van der Waals e o efeito total, de muitos pares de átomos somados, pode ser substancial.

Propriedades da água. A água é o solvente no qual a maior parte das reações bioquímicas ocorre, e suas propriedades são essenciais à formação das estruturas macromoleculares e para a ocorrência das reações químicas. Duas propriedades da água são especialmente relevantes:



1. *A água é uma molécula polar*. A molécula de água é curvada, não linear, de modo que a distribuição das cargas é assimétrica. O núcleo do oxigênio atrai os elétrons dos dois núcleos dos hidrogênios, o que deixa a região em torno de cada átomo de hidrogênio com uma carga positiva. Portanto, a molécula de água é uma estrutura eletricamente polar.

2. *A água é altamente coesiva.* As moléculas de água interagem intensamente umas com as outras por pontes de hidrogênio. Tais interações são evidentes na estrutura do gelo (Figura 1.11). Redes de pontes de hidrogênio mantêm a estrutura unida; interações semelhantes ligam moléculas no estado líquido da água e explicam a sua coesão, embora, no estado líquido, aproximadamente um quarto das pontes de hidrogênio presentes no gelo são rompidas. A natureza polar da água é responsável por uma constante dielétrica alta: 80. As moléculas em solução aquosa interagem com as moléculas de água por meio de pontes de hidrogênio e por meio de interações iônicas. Tais interações fazem da água um solvente versátil, capaz de dissolver rapidamente muitos compostos, especialmente aqueles polares e eletricamente carregados, que podem participar destas interações.

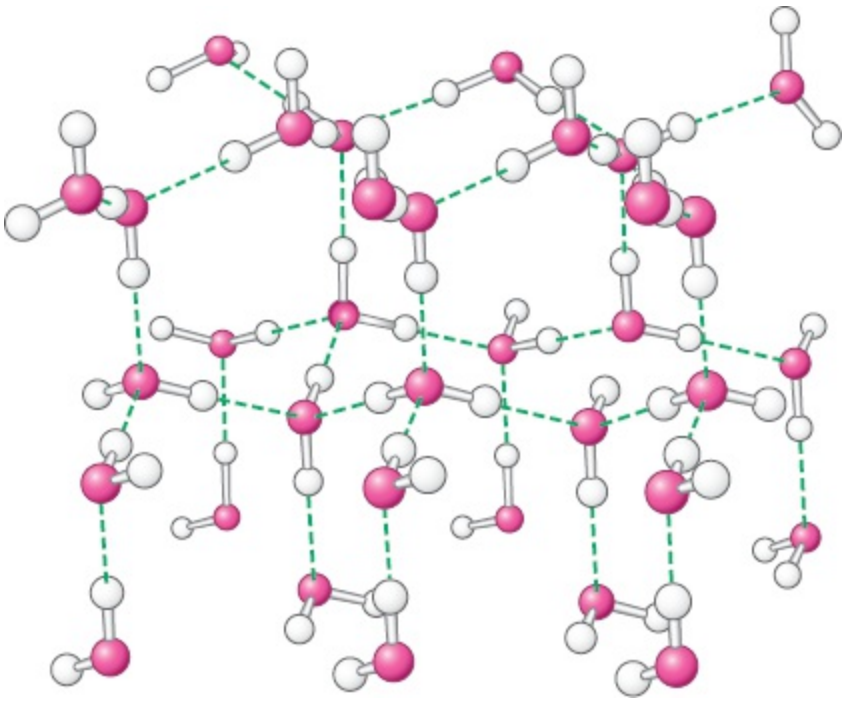


Figura 1.11 Estrutura do gelo. As pontes de hidrogênio (mostradas como linhas tracejadas verdes) são formadas entre as moléculas de água para produzir uma estrutura altamente ordenada e aberta.

Efeito hidrofóbico. A última interação fundamental é chamada de *efeito hidrofóbico* e é a manifestação das propriedades da água. Algumas moléculas (chamadas de *moléculas apolares*) não podem formar pontes de hidrogênio ou interações iônicas. A interação de moléculas apolares com a molécula de água não é tão favorável quanto as interações entre as moléculas de água entre si. As moléculas de água em contato com estas moléculas apolares formam "cavidades" em torno destas, tornando-se mais ordenadas que as moléculas de água livres em solução. No entanto, quando duas moléculas apolares se aproximam, algumas moléculas de água são liberadas, permitindo que elas interajam livremente com o restante da água. (Figura 1.12). A liberação da água destas "cavidades" é favorável por motivos que serão consideradas adiante. O resultado é tal que moléculas apolares exibem uma tendência maior a se associarem umas às outras em água, em comparação com outros solventes menos polares e autoassociáveis. Esta tendência é chamada de efeito hidrofóbico, e as

interações associadas são chamadas de *interações hidrofóbicas*.

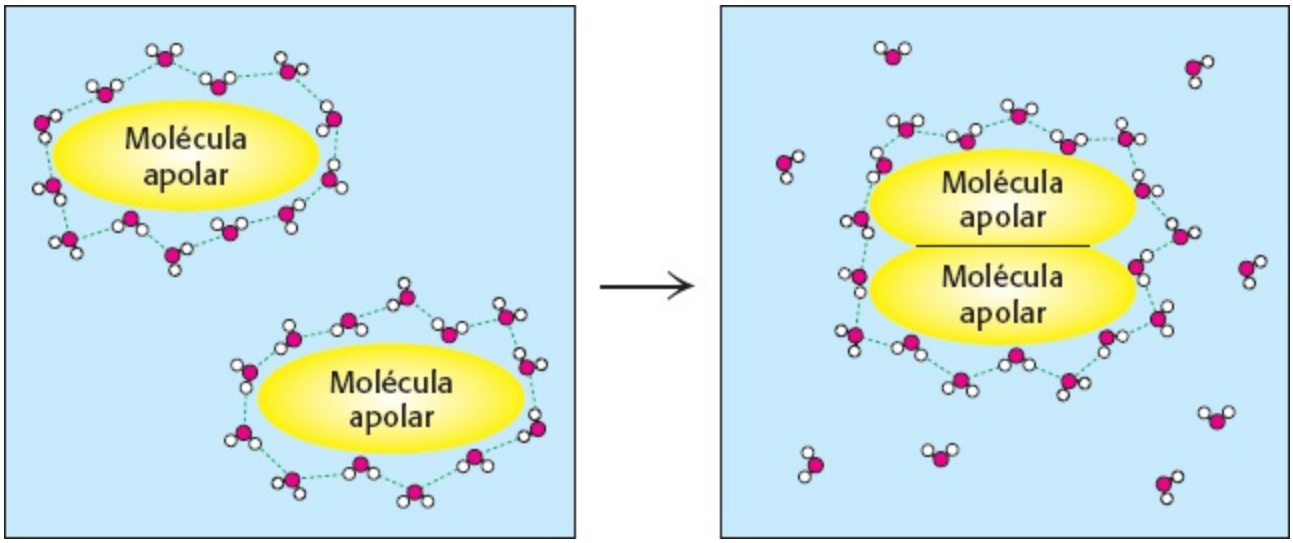


Figura 1.12 Efeito hidrofóbico. A agregação de grupos apolares em água leva à liberação de moléculas de água, inicialmente interagindo com as superfícies apolares, no restante da água. A liberação de moléculas de água em solução torna favorável a agregação de grupos apolares.

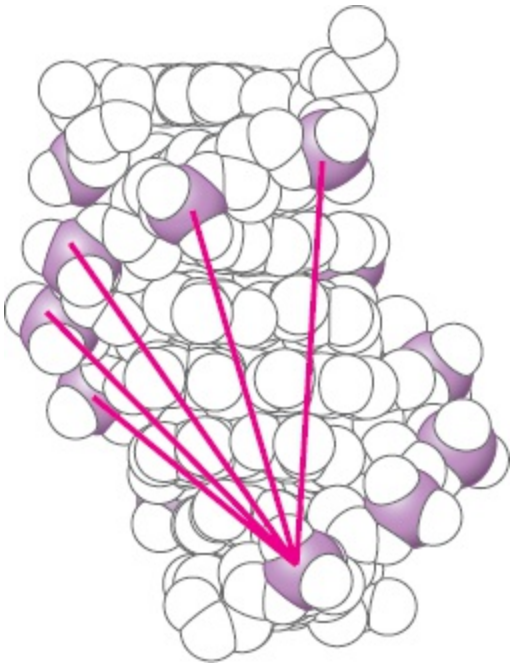


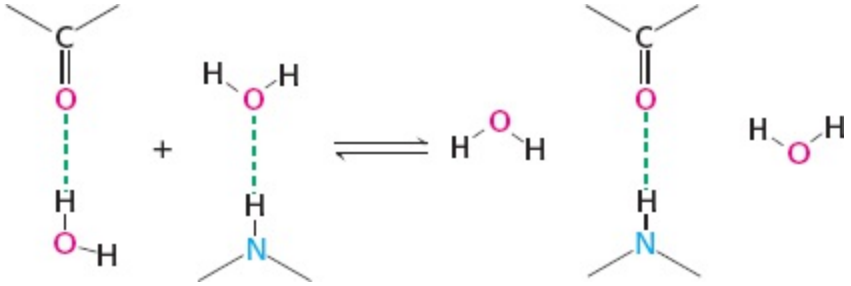
Figura 1.13 Interações eletrostáticas no DNA. Cada unidade dentro da dupla hélice inclui um grupo fosfato (o átomo de fósforo é mostrado em violeta) que possui uma carga negativa. As interações desfavoráveis de um fosfato com vários outros são mostradas pelas linhas vermelhas. Tais interações repulsivas se opõem à formação da dupla hélice.

A dupla hélice é uma expressão das regras da química

Vejamos então como as quatro interações não covalentes atuam em conjunto estabelecendo a associação dos duas fitas de DNA formando a dupla hélice. Primeiramente, cada grupo fosfato em uma fita de DNA possui uma carga negativa. Estes grupos carregados negativamente interagem desfavoravelmente uns com os outros a distância. Deste modo, interações eletrostáticas desfavoráveis ocorrem quando duas fitas de DNA se aproximam. Estes grupos fosfatos estão bem longe um do outro na dupla hélice, com distâncias maiores que 10 Å, mas algumas destas interações ocorrem (Figura 1.13). Assim, interações eletrostáticas se opõem à formação da dupla hélice. A

força destas interações eletrostáticas repulsivas diminui devido à constante dielétrico elevado da água e à presença de espécies iônicas como íons de Na^+ e Mg^{2+} na solução. Esses cátions interagem com os grupos fosfatos parcialmente neutralizando as suas cargas negativas.

Em segundo lugar, como mencionado anteriormente, as pontes de hidrogênio são importantes na determinação da formação dos pares de bases específicos da dupla hélice. No entanto, no DNA de fita simples, os doadores e aceptores de pontes de hidrogênio são expostos à solução e podem formar pontes de hidrogênio com as moléculas da água.



Quando duas fitas se unem, as pontes de hidrogênio com a água se quebram e novas pontes de hidrogênio, entre as bases, são formadas. Como o número de pontes de hidrogênio quebradas e formadas é o mesmo, estas pontes de hidrogênio não contribuem substancialmente para o processo de formação da dupla hélice. No entanto, elas contribuem consideravelmente para a especificidade do pareamento. Suponha que duas bases que não podem formar o pareamento de Watson e Crick se aproximem; as pontes de hidrogênio com a água devem ser quebradas para que as bases se unam. Como estas bases não são estruturalmente complementares, nem todas as pontes de hidrogênio com a água podem ser simultaneamente substituídas pelas pontes entre as bases. Desse modo, a formação da dupla hélice entre sequências não complementares é desfavorecida.

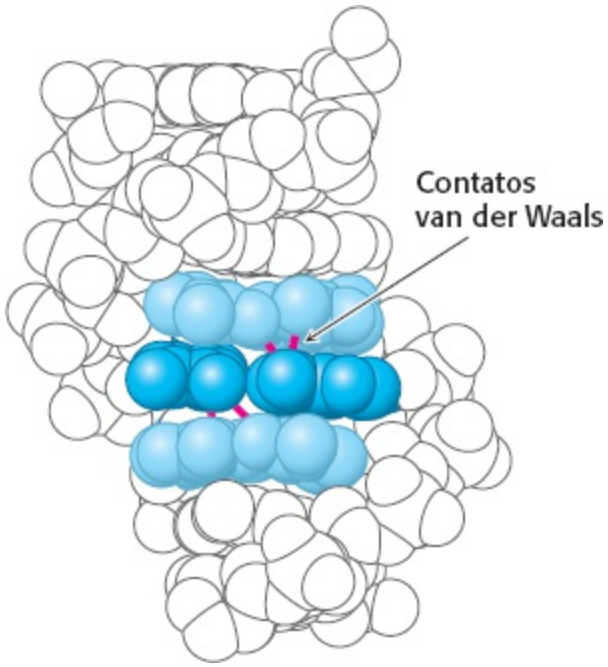


Figura 1.14 Empilhamento das bases. Na dupla hélice de DNA, os pares de bases adjacentes são empilhados aproximadamente um sobre o outro, e, deste modo, muitos átomos em cada base são separados pela distância de contato van der Waals. O par de base central é mostrado em azul-escuro, e seus dois pares adjacentes são mostrados em azul-claro. Vários contatos van der Waals são mostrados em vermelho.

Em terceiro lugar, internamente à dupla hélice, os pares de base são paralelos e dispostos aproximadamente um sobre o outro. A separação típica entre os planos adjacentes de pares de bases é de 3,4 Å, e as distâncias entre os átomos mais próximos é de cerca de 3,6 Å. Esta distância corresponde bem à distância de contato de van der Waals (Figura 1.14). As bases tendem a se empilhar mesmo em moléculas de DNA de fita simples. Entretanto, as interações de van der Waals associadas ao empilhamento das bases estão mais próximas ao ideal na estrutura de dupla hélice.

Em quarto lugar, o efeito hidrofóbico também contribui para o favorecimento do empilhamento das bases. O empilhamento mais completo das bases dispõe suas superfícies apolares fora da água e em contato umas com as outras.

Os fundamentos da formação da dupla hélice entre as duas fitas de DNA se aplicam a muitos processos bioquímicos. Muitas interações fracas contribuem para o balanço energético geral do processo, algumas favoravelmente, outras não. Além disso, a complementaridade de superfícies é uma característica-chave: quando as superfícies complementares se encontram, os doadores de pontes de hidrogênio se alinham com os aceptores e as superfícies apolares se unem para maximizar as interações de van der Waals e minimizar a área da superfície apolar exposta ao ambiente aquoso. As propriedades da água têm papel relevante na determinação da importância destas interações.

As leis da termodinâmica regem o comportamento dos sistemas bioquímicos

Podemos observar a formação da dupla hélice sob uma perspectiva diferente, examinando as leis da termodinâmica. Tais leis são princípios gerais que se aplicam a todos os processos físicos (e biológicos). São de grande importância porque determinam as condições sob as quais processos específicos podem ou não ocorrer. Primeiramente, consideraremos estas leis sob uma perspectiva geral e, depois, as aplicaremos aos princípios que desenvolvemos para a formação da dupla hélice.

As leis da termodinâmica distinguem entre um sistema e seus arredores. Um *sistema* refere-se à matéria dentro de uma dada região definida do espaço. A matéria no resto do universo é chamada de *vizinhança. A Primeira Lei da Termodinâmica estabelece que a energia total de um sistema e sua vizinhança é constante.* Em outras palavras, o conteúdo total de energia do universo é constante; a energia não pode ser criada nem destruída. No entanto, a energia pode ter diferentes formas. O calor, por exemplo, é uma forma de energia. O calor é a manifestação da *energia cinética* associada ao movimento aleatório das moléculas. Alternativamente, a energia pode se apresentar como *energia potencial* – energia que será liberada na ocorrência de algum processo. Considere, por exemplo, uma bola segurada no topo de uma torre. A bola tem uma considerável energia potencial porque, quando for liberada, desenvolverá a energia cinética associada ao seu movimento à medida que cair. Em sistemas químicos, a energia potencial está associada à tendência dos átomos de reagirem entre si. Por exemplo, uma mistura de gasolina e oxigênio tem uma grande energia potencial, porque estas moléculas podem reagir para formar dióxido de carbono e água, liberando energia na forma de calor. A Primeira Lei requer que qualquer energia liberada na formação de ligações químicas seja usada para quebrar outras ligações, liberada como calor ou armazenada de algum outro modo.

Outro conceito termodinâmico importante é o de *entropia*, uma medida do grau de aleatoriedade ou desordem de um sistema. *A Segunda Lei da Termodinâmica estabelece que a entropia total de um sistema, somada à energia de sua vizinhança, sempre aumenta.* Por exemplo, a liberação da água das superfícies apolares responsáveis pelo efeito hidrofóbico é favorável porque as moléculas

de água livres em solução são mais desordenadas do que quando estão associadas às superfícies apolares. À primeira vista, a Segunda Lei parece contradizer muito o senso comum, particularmente sobre os sistemas biológicos. Muitos processos biológicos, como a geração de uma folha a partir de dióxido de carbono e outros nutrientes, claramente aumentam o nível de ordem e, assim, diminuem a entropia. A entropia pode ser diminuída localmente na formação de tais estruturas organizadas apenas se a entropia de outras partes do universo aumentar na mesma proporção – ou mais. A diminuição local de entropia comumente ocorre pela liberação de calor, o que aumenta a entropia da vizinhança.

Podemos analisar este processo em termos quantitativos. Primeiramente, considere o sistema. A entropia (S) do sistema pode mudar ao longo da reação química em uma quantidade $\Delta S_{\text{sistema}}$. Se o calor fluir do sistema para a vizinhança, então este calor, geralmente conhecido como *entalpia* (H) do sistema, será reduzido de uma quantidade de $\Delta H_{\text{sistema}}$. Para aplicar a Segunda Lei, devemos determinar a mudança de entropia da vizinhança. Se o calor fluir do sistema para a vizinhança, a entropia da vizinhança aumentará. A mudança precisa da entropia da vizinhança depende da temperatura; a mudança na entropia é maior quando o calor é adicionado às vizinhanças relativamente frias do que quando o calor é adicionado às vizinhanças em altas temperaturas, que já exibem alta desordem. Para ser mais específico, a mudança de entropia da vizinhança será proporcional à quantidade de calor transferido do sistema e inversamente proporcional à temperatura (T) da vizinhança. Em sistemas biológicos, T [em kelvins (K), temperatura absoluta] é geralmente considerado constante. Assim, a mudança na entropia da vizinhança é dada por

$$\Delta S_{\text{sistema}} > \Delta H_{\text{sistema}}/T \qquad (6)$$

A mudança total de entropia é dada pela expressão

$$\Delta S_{\text{total}} = \Delta S_{\text{sistema}} + \Delta S_{\text{vizinhança}} \qquad (2)$$

Substituindo a equação 1 na equação 2, temos

$$\Delta S_{\text{total}} = S_{\text{sistema}} - \Delta H_{\text{sistema}}/T \qquad (3)$$

Multiplicando por $-T$

$$-T\Delta S_{\text{total}} = \Delta H_{\text{sistema}} - T\Delta S_{\text{sistema}} \qquad (4)$$

A função $-T\Delta S$ tem unidade de energia e é referida como *energia livre* ou *energia livre de Gibbs,* por Josiaj Willard Gibbs, que desenvolveu esta função em 1878:

$$\Delta G = \Delta H_{\text{sistema}} - T\Delta S_{\text{sistema}} \qquad (5)$$

A mudança de energia livre, ΔG, será usada por todo este livro para descrever a energética das reações bioquímicas. A energia livre de Gibbs é essencialmente uma ferramenta de consideração que registra tanto a entropia do sistema (diretamente) quanto a entropia da vizinhança (na forma de calor liberado pelo sistema).

Lembre-se de que a Segunda Lei da Termodinâmica estabelece que, para que um processo ocorra, a entropia do universo deve aumentar. Examinando a equação 3 vemos que a entropia aumentará se, e

somente se

$$\Delta S_{\text{sistema}} > \Delta H_{\text{sistema}}/T \qquad (6)$$

Reorganizando, temos $T\Delta S_{\text{sistema}} > \Delta H$ ou, em outras palavras, a entropia aumentará se, e somente se

$$\Delta G = \Delta H_{\text{sistema}} - T\Delta S_{\text{sistema}} < 0 \qquad (7)$$

Assim, a mudança de energia livre deve ser negativa para que um processo ocorra espontaneamente. *Há uma mudança negativa de energia livre quando, e somente quando, a entropia total do universo aumenta.* Novamente, a energia livre representa um termo simples que considera tanto a entropia do sistema quanto a entropia da vizinhança.

Calor é liberado na formação da dupla hélice

Vejamos como os princípios da termodinâmica se aplicam à formação da dupla hélice (Figura 1.15). Imagine que soluções contendo cada um das duas fitas são misturadas. Antes que a dupla hélice se forme, cada uma das fitas se movimenta livremente na solução, enquanto cada fita pareada deve se mover em conjunto. Além disso, as fitas separadas se apresentam em mais conformações do que quando ligadas em dupla hélice. Assim, a formação da dupla hélice a partir das fitas simples parece causar um aumento na ordem do sistema, ou seja, um decréscimo da entropia do sistema.

Com base nesta análise, esperamos que a dupla hélice não possa ser formada sem violar a Segunda Lei da Termodinâmica, a não ser que seja liberado calor para aumentar a entropia da vizinhança. Experimentalmente podemos medir o calor liberado permitindo que as soluções contendo as duas fitas simples se unam em água, o que corresponderia à vizinhança. Determinamos então quanto calor deve ser absorvido pela água ou liberado desta para mantê-la em temperatura constante. Este experimento revela que uma quantidade substancial de calor é liberada – de fato, aproximadamente 250 kJ mol^{-1} (60 kcal mol^{-1}). Este resultado experimental mostra que a mudança na entalpia do processo é bem grande, –250 kJ mol^{-1}, de acordo com nossa expectativa de que uma quantidade significativa de calor deveria ser liberada para a vizinhança para que o processo não violasse a Segunda Lei. Vemos, em termos quantitativos, como a organização de um sistema pode aumentar pela liberação de calor suficiente para a vizinhança assegurando que a entropia do universo aumente. Reencontraremos este tema ao longo do livro.

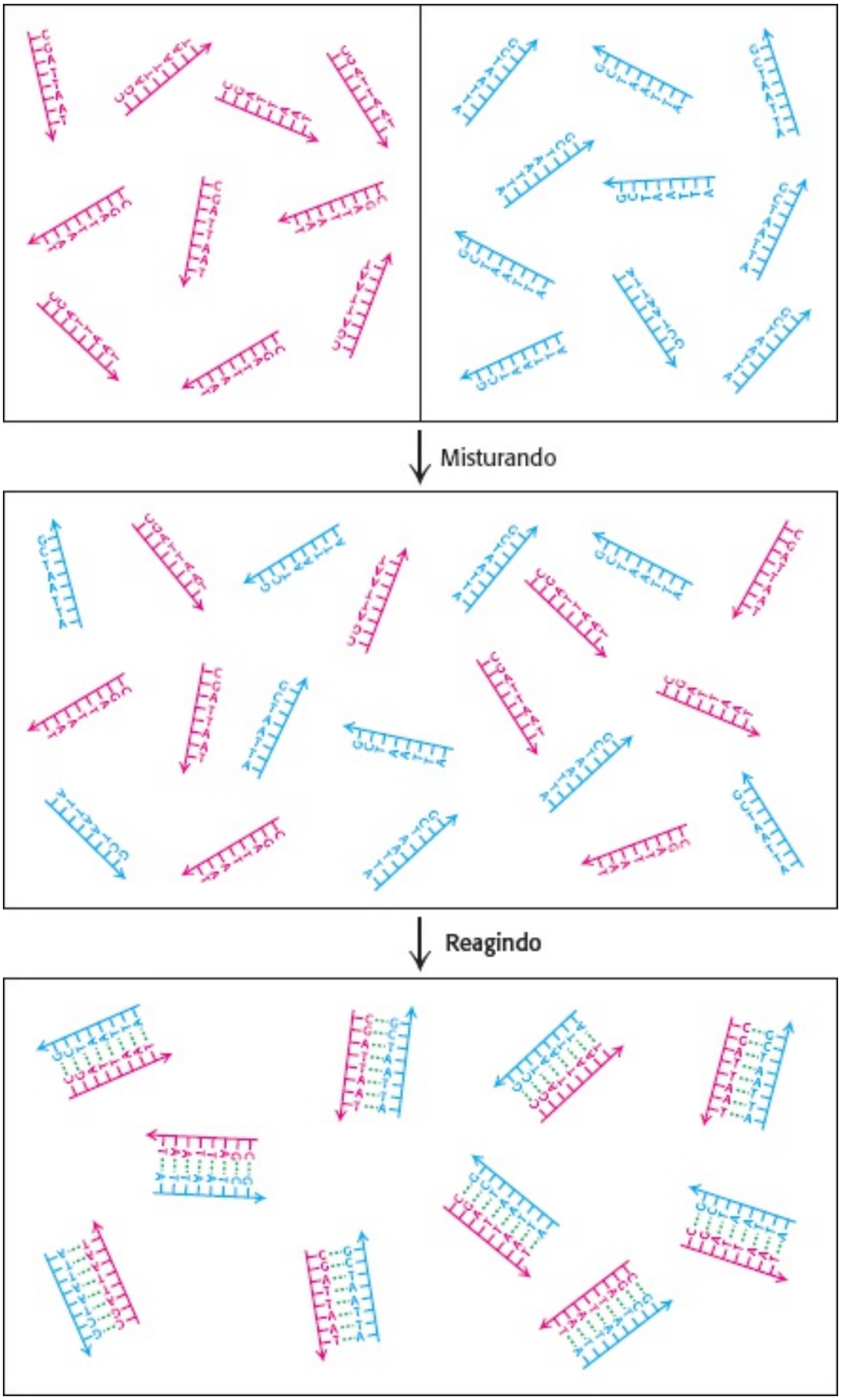


Figura 1.15 Formação da dupla hélice e entropia. Quando soluções contendo filamentos de DNA e suas sequências complementares são misturadas, as fitas simples de DNA reagem para formar as duplas hélices. O processo causa uma diminuição da entropia do sistema, indicando que calor deve ser liberado para a vizinhança para evitar a violação da Segunda Lei da Termodinâmica.

Reações ácido-base são centrais em muitos processos bioquímicos

Ao longo de nossas considerações sobre a formação da dupla hélice, lidamos apenas com as ligações não covalentes formadas ou quebradas neste processo. Muitos processos bioquímicos relacionam-se com a formação e quebra de ligações covalentes. Uma classe de reações particularmente importante na bioquímica são as *reações ácido-base*.

Em reações ácido-base, os íons de hidrogênio são adicionados ou removidos de moléculas. Ao longo deste livro, encontraremos muitos processos nos quais a adição ou remoção de hidrogênios é

crucial, como os processos metabólicos pelos quais os carboidratos são consumidos para liberar energia para outros fins. Assim, um conhecimento pormenorizado dos princípios básicos destas reações é essencial.

Um íon de hidrogênio, geralmente representado por H^+, corresponde a um próton. Na verdade, íons de hidrogênio estão presentes em soluções ligados às moléculas de água, formando, assim, *íons hidrônio*, H_3O^+. Para simplificar, continuaremos a representá-los como H^+, mas mantenha em mente que o H^+ é uma simplificação para os íons presentes de fato.

A concentração dos íons de hidrogênio em solução é expressa como o pH. Especificamente, o *pH* de uma solução é definido por

$$\text{pH} = -\log[H^+]$$

em que o $[H^+]$ tem unidades de molaridade. Portanto, pH 7,0 refere-se a uma solução para a qual $-\log[H^+] = 7{,}0$, e assim o $\log[H^+] = -7{,}0$ e $[H^+] = 10^{\log[H+]} = 10^{-7{,}0} = 1{,}0 \times 10^{-7}$ M.

O pH também expressa indiretamente a concentração de íons hidroxila $[OH^-]$ em uma solução. Para entender como, devemos ter em mente que as moléculas de água se dissociam para formar íons H^+ e OH^-, em um processo de equilíbrio.

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$

A constante de equilíbrio (K) para a dissociação da água é definida por

$$K = [H^+][OH^-]/[H_2O]$$

e tem o valor de $K = 1{,}8 \times 10^{-16}$. Perceba que a constante de equilíbrio formalmente não tem unidade. No entanto, o valor dado para a constante de equilíbrio considera que unidades específicas são usadas para concentração; neste caso – e em muitos outros –, a unidade de molaridade (M) é considerada.

A concentração de água, $[H_2O]$, em água destilada (água pura) é 55,5 M, e esta concentração é constante sob a maior parte das condições. Assim, podemos definir uma nova constante, K_W:

$$K_W = K[H_2O] = [H^+][OH^-]$$

$$K[H_2O] = 1{,}8 \times 10^{-16} \times 55{,}5$$

$$= 1{,}0 \times 10^{-14}$$

Como $K_W = [H^+][OH^-] = 1{,}0 \times 10^{-14}$, podemos calcular

$$[OH^-] = 10^{-14}/[H^+] \text{ e } [H^+] = 10^{-14}/[OH^-]$$

Mantendo em mente estas relações, dado o pH, podemos facilmente calcular a concentração dos íons hidroxila em solução aquosa. Por exemplo, em pH = 7,0, sabemos que $[H^+] = 10^{-7}$ e, portanto, $[OH^-] = 10^{-14}/10^{-7} = 10^{-7}$ M. Em soluções ácidas, a concentração dos íons hidrogênio é maior que 10^{-7} e, portanto, o pH é menor que 7,0. Por exemplo, em 0,1 M HCl, $[H^+] = 10^{-1}$ M e, assim, o pH = 1,0 e $[OH^-] = 10^{-14}/10^{-1} = 10^{-13}$ M.

Reações ácido-base podem romper a dupla hélice

A reação que consideramos entre as duas fitas de DNA para a formação da dupla hélice ocorre

prontamente em pH 7,0. Imagine que temos uma solução contendo DNA em dupla hélice e adicionamos a ela uma solução concentrada de base (ou seja, alta concentração de OH^-). À medida que a base é adicionada, monitoramos o pH e a quantidade do DNA em dupla hélice (Figura 1.16). Quando as primeiras adições de base são feitas, o pH aumenta, mas a concentração de DNA em dupla hélice não muda significativamente. No entanto, à medida que o pH se aproxima de 9,0, o DNA em dupla hélice começa a se dissociar em seus fitas simples. À medida que o pH continua aumentando de 9 para 10, esta dissociação torna-se praticamente completa. Por que as duas fitas se dissociam? Os íons hidroxila podem reagir com as bases dos pares de base do DNA e remover alguns prótons. O próton mais suscetível é aquele ligado ao átomo de nitrogênio N-1 das bases de guanina.

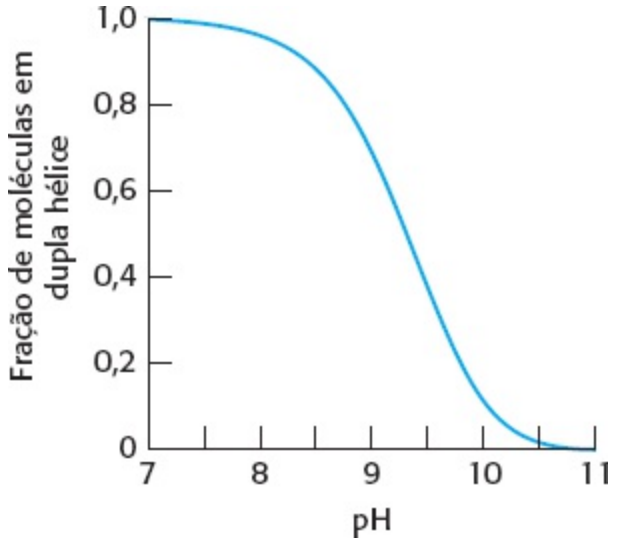
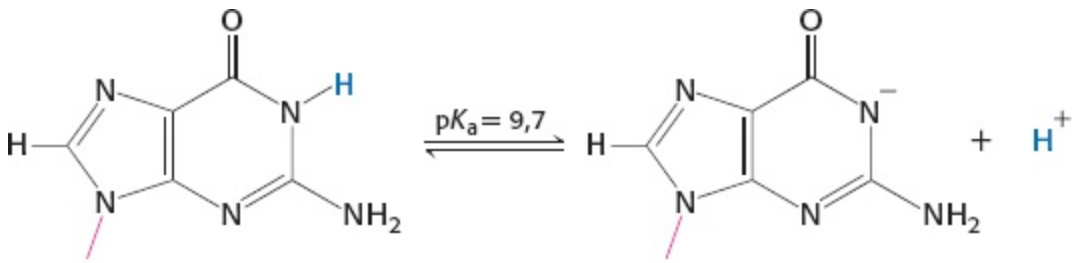


Figura 1.16 Desnaturação do DNA pela adição de base. A adição de base à solução de DNA em dupla hélice inicialmente em pH 7,0 causa a separação da dupla hélice em fitas simples. Metade do processo se completa em um pH um pouco maior que 9.



Guanina (G)

A dissociação do próton para uma substância HA tem uma constante de equilíbrio dada pela equação

$$K_a = [H^+][A^-]/[HA]$$

A suscetibilidade de um próton ser removido por uma base é descrita por seu *valor de pKa*:

$$pK_a = -\log(K_a)$$

Quando o pH é igual ao pK_a, temos

$$pH = pK_a$$

e, assim,

$$-\log[H^+] = -\log([H^+][A^-]/[HA])$$

e

$$[H^+] = [H^+][A^-]/[HA]$$

Dividindo por $[H^+]$, temos que

$$1 = [A^-]/[HA]$$

e, assim,

$$[A^-] = [HA]$$

Deste modo, quando o pH se iguala ao pK_a, a concentração da forma desprotonada do grupo ou molécula é igual à concentração da forma protonada; o processo de desprotonação está na metade de seu término.

O pK_a para o próton N-1 da guanina normalmente é 9,7. Quando o pH se aproxima deste valor, o próton em N-1 se perde (Figura 1.16). Como este próton participa em uma ponte de hidrogênio importante, sua perda desestabiliza substancialmente a dupla hélice de DNA. A dupla hélice de DNA também é desestabilizada em pH *baixo*. Abaixo do pH 5, alguns aceptores de pontes de hidrogênio que participam do pareamento de bases tornam-se protonados. Em suas formas protonadas, estas bases não podem mais formar pontes de hidrogênio e a dupla hélice se separa. Desta modo, as reações ácido-base que podem remover ou doar prótons em posições específicas das bases do DNA podem romper a dupla hélice.

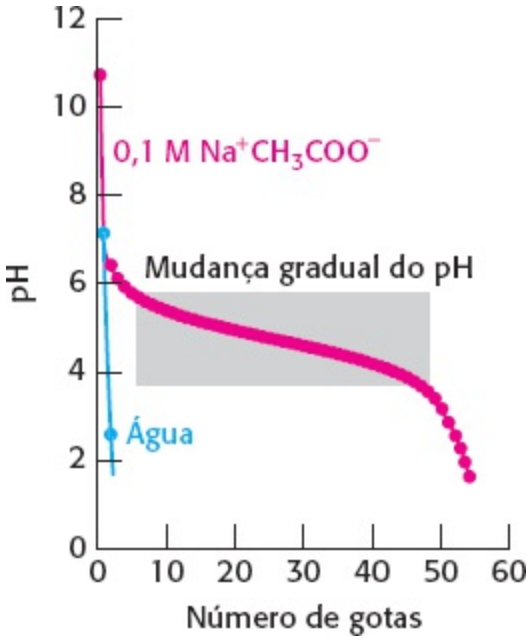


Figura 1.17 Ação do tampão. A adição de um ácido forte, 1 M de HCl, à água destilada causa uma queda imediata no pH, próximo de 2. Em contraste, a adição de um ácido a uma solução de 0,1 M de acetato de sódio ($Na^+CH_3COO^-$) causa uma mudança mais gradual no pH, até que o pH caia a menos de 3,5.

Tampões regulam o pH em organismos e no laboratório

Essas observações sobre o DNA revelam que uma mudança significativa do pH pode romper a estrutura molecular. O mesmo é válido para muitas outras macromoléculas biológicas; mudanças no

pH podem protonar ou desprotonar grupos-chave, potencialmente rompendo estruturas e iniciando reações deletérias. Portanto, os sistemas biológicos evoluíram de modo a minimizar mudanças do pH. Soluções que resistem a tais mudanças são chamadas de *tampões*. Especificamente, quando ácido é adicionado a uma solução aquosa não tamponada, o pH cai proporcionalmente à quantidade de ácido adicionado. Por outro lado, quando ácido é adicionado a uma solução tamponada, o pH cai mais gradualmente. Os tampões também podem atenuar o aumento de pH causado pela adição de bases e mudanças de pH causadas pela diluição da solução.

Compare o resultado da adição de uma solução de 1 M de ácido forte HCl, gota a gota, à água destilada com a adição deste mesmo ácido a uma solução contendo 100 mM do tampão acetato de sódio ($Na^+CH_3COO^-$; Figura 1.17). O processo de adição gradual de quantidades conhecidas de um reagente em uma solução na qual o reagente reage enquanto se monitoram os resultados é chamado de *titulação*. Para a água destilada, o pH cai de 7 para próximo de 2 em função da adição das primeiras poucas gotas de ácido. No entanto, para a solução com acetato de sódio, primeiramente o pH cai rapidamente de seu valor inicial para um valor próximo de 10, depois muda mais gradualmente até que o pH atinge 3,5, e depois cai mais rapidamente de novo. Por que o pH diminui gradualmente no meio da titulação? A resposta é que, quando os íons de hidrogênio são adicionados a esta solução, eles reagem com os íons de acetato para formar ácido acético. Esta reação consome alguns dos íons de hidrogênios adicionados, de modo que o pH não caia. Os íons de hidrogênio continuam a reagir com os íons de acetato até que essencialmente todo o acetato seja convertido em ácido acético. Após este ponto, os prótons adicionados permanecem livres em solução e o pH começa a cair mais drasticamente de novo.

Podemos analisar o efeito da adição do tampão em termos quantitativos. A constante de equilíbrio para a desprotonação de um ácido é

$$K_a = [H^+][A^-]/[HA]$$

Aplicando o logaritmo a ambos os lados, temos

$$\log(K_a) = \log([H^+]) + \log([A^-]/[HA])$$

Lembrando das definições de pK_a e pH e reorganizando, temos

$$pH = pK_a + \log([A^-]/[HA])$$

Esta equação é conhecida como a *equação de Henderson-Hasselbalch*.

Podemos aplicar a equação à nossa titulação do acetato de sódio. O pK_a do ácido acético é de 4,75. Podemos calcular a razão das concentração do íon de acetato e o ácido acético como uma função do pH utilizando a equação de Henderson-Hasselbalch, ligeiramente modificada.

$$[\text{Íon de acetato}]/[\text{ácido acético}] = [A^-]/[HA] = 10^{pH-pK^a}$$

Em pH 9, esta razão é de $10^{9-4,75} = 10^{4,25} = 17,80$; pouco ácido acético foi formado. Em pH 4,75 (quando o pH está igual ao pK_a), a razão é de $10^{4,75-4,75} = 10^0 = 1$. Em pH 3, a razão é de $10^{3-4,75} = 10^{-1,25} = 0,02$; quase todo o íon de acetato foi convertido em ácido acético. Podemos acompanhar a conversão do íon acetato em ácido acético por toda a titulação (Figura 1.18). O gráfico mostra que a região de pH relativamente constante corresponde precisamente à região na qual o íon de acetato está sendo protonado à sua forma de ácido acético.

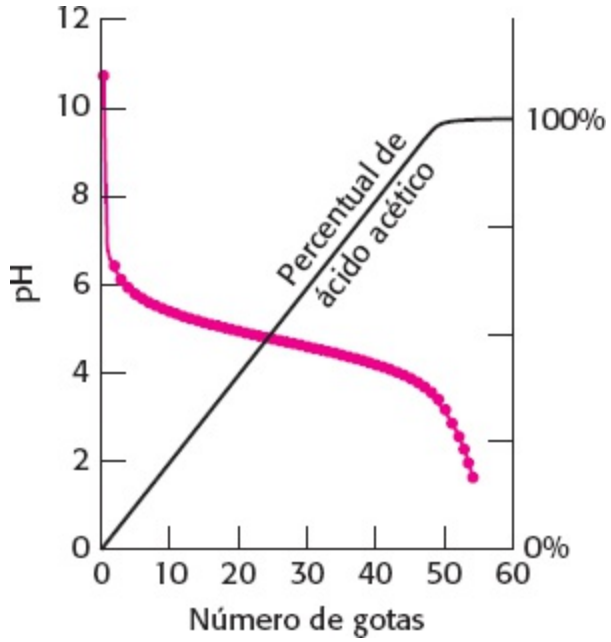


Figura 1.18 Protonação do tampão. Quando o ácido é adicionado ao acetato de sódio, os íons de hidrogênio adicionados são usados para converter o íon de acetato em ácido acético. Como a concentração de prótons não aumenta significativamente, o pH permanece relativamente constante até que todo o acetato seja convertido em ácido acético.

A partir desta discussão, podemos ver que um tampão funciona melhor próximo do pK_a de seu componente ácido. O pH fisiológico é próximo de 7,4. Um tampão importante dos sistemas biológicos é fundamentado no ácido fosfórico (H_3PO_4). O ácido pode ser desprotonado em três passos para formar o íon fosfato.

$$H_3PO_4 \underset{}{\overset{H^+}{\rightleftharpoons}} H_2PO_4^- \qquad p\mathit{K}_a = 2{,}12$$

$$H_2PO_4^- \overset{H^+}{\rightleftharpoons} HPO_4^{2-} \qquad p\mathit{K}_a = 7{,}21$$

$$HPO_4^{2-} \overset{H^+}{\rightleftharpoons} PO_4^{3-} \qquad p\mathit{K}_a = 12{,}67$$

Em um pH de aproximadamente 7,4, o fosfato inorgânico existe primariamente como uma mistura proporcional de $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-}. Desta maneira, as soluções de fosfato atuam como tampões efetivos em pH próximos de 7,4. A concentração do fosfato inorgânico no sangue é de aproximadamente 1 mM, fornecendo um tampão útil contra processos que produzam tanto bases quanto ácidos. Podemos examinar esta utilidade em termos quantitativos utilizando a equação de Henderson-Hasselbalch. Qual a concentração de ácido que deve ser adicionada para mudar o pH de 7,4 para 7,3 de um tampão fosfato de 1 mM? Sem tampão, esta mudança de $[H^+]$ corresponde a uma mudança de $10^{-7,3} - 10^{-7,4}$ M = $(5{,}0 \times 10^{-8} - 4{,}0 \times 10^{-8})$ M = $1{,}0 \times 10^{-8}$ M. Consideremos o que ocorre com os componentes do tampão. Em pH 7,4,

$$[HPO_4^{2-}]/[H_2PO_4^-] = 10^{7,4-7,21} = 10^{0,19} = 1{,}55$$

A concentração total do fosfato é de 1 mM, $[HPO_4^{2-}] + [H_2PO_4^-]$. Deste modo,

$$[HPO_4^{2-}] = (1{,}55/2{,}55) \times 1 \text{ mM} = 0{,}608 \text{ mM}$$

e

$$[H_2PO_4^-] = (1/2{,}55) \times 1 \text{ mM} = 0{,}392$$

Em pH 7,3,

$$[HPO_4^{2-}]/[H_2PO_4^-] = 10^{7,3-7,21} = 10^{0,09} = 1,23$$

e, assim,

$$[HPO_4^{2-}] = (1,23/2,23) = 0,552 \text{ mM}$$

e

$$[H_2PO_4^-] = (1/2,23) = 0,448 \text{ mM}$$

Portanto, (0,608 – 0,552) = 0,056 mM de HPO_4^{2-} é convertido em $H_2PO_4^-$, consumindo 0,056 mM = $5,6 \times 10^{-5}$ M $[H^+]$. Assim, o tampão aumenta a quantidade de ácido necessário para produzir uma queda de 7,4 para 7,3 no pH por um fator de $5,6 \times 10^{-5}/1,0 \times 10^{-8}$ = 5.600, quando comparado à água destilada.

1.4 A revolução da genômica está transformando a bioquímica e a medicina

A descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick lançou a hipótese de que a informação hereditária está armazenada como uma sequência de bases ao longo das fitas de DNA. Esta grande ideia originou uma abordagem completamente nova sobre a biologia. No entanto, quando a descoberta de Watson e Crick ocorreu, tinha muito potencial, mas as consequências práticas não estavam claras. Questões extremamente fundamentais permaneceram em aberto. A hipótese está correta? Como a informação destas sequências é lida e transformada em ação? Quais são as sequências que ocorrem naturalmente no DNA e como tais sequências podem ser determinadas experimentalmente? Por meio de avanços na bioquímica e em campos relacionados, temos hoje respostas praticamente completas para estas perguntas. De fato, por volta da década passada, pesquisadores determinaram as sequências genômicas completas de centenas de organismos diferentes, incluindo microrganismos simples, plantas, animais de níveis variáveis de complexidade e seres humanos. Comparações destas sequências genômicas por meio dos métodos apresentados no Capítulo 6 têm sido fontes de ideias em vários aspectos da bioquímica. Em função destas conquistas, a bioquímica tem sido transformada. Além dos aspectos experimentais e clínicos, a bioquímica agora se transformou em uma *ciência da informação*.

O sequenciamento do genoma humano é um marco da história humana

O sequenciamento do genoma humano foi uma tarefa assombrosa, uma vez que contém aproximadamente três bilhões (3×10^9) de pares de bases. Por exemplo, a sequência

ACATTTGCTTCTGACACAA
CTGTGTTCACTAGCAACCTC
AAACAGACACCATGG
TGCATCTGACTCCTG**A**GGAGAAGT
CTGCCGTTACTGCCCTGT
GGGGCAAGGTGAACGTGGA…

é parte de um dos genes que codificam a hemoglobina, a transportadora de oxigênio em nosso sangue.

Este gene é encontrado no fim do cromossomo 9, entre 24 outros cromossomos. Se fossemos incluir a sequência completa de todo nosso genoma, este capítulo teria mais de 500.000 páginas. O sequenciamento do nosso genoma é verdadeiramente um marco na história humana. Esta sequência contém grande quantidade de informações, algumas podemos extrair e interpretar, mas muitas outras estamos apenas começando a entender. Por exemplo, algumas doenças humanas foram associadas a variações particulares da sequência genômica. A anemia falciforme, abordada em detalhes no Capítulo 7, é causada por uma simples mudança de base de um A (destacado em negrito na sequência anterior) por um T. Encontraremos muitos outros exemplos de doenças que foram associadas a alterações específicas da sequência do DNA.

Além das implicações na compreensão da saúde e das doenças dos seres humanos, a sequência genômica é fonte de profundo conhecimento sobre outros aspectos da biologia e cultura humanas. Por exemplo, por meio da comparação das sequências individuais de pessoas e populações diferentes, podemos aprender muito sobre a história humana. Com base em tais análises, pode ser lançada uma hipótese convincente sobre a origem da espécie humana na África, e até mesmo pode ser demonstrado o momento de importantes migrações de grupos de seres humanos. Finalmente, comparações do genoma humano com os genomas de outros organismos estão confirmando a enorme unidade que existe no nível bioquímico e revelando passos-chave, tomados ao longo do curso evolutivo, partindo de organismos relativamente simples, unicelulares, até os organismos multicelulares complexos, como o ser humano. Por exemplo, muitos genes que são essenciais para o funcionamento do cérebro humano e do sistema nervoso têm origens evolutivas e funcionais que podem ser reconhecidos no genoma bacteriano. Como muitas pesquisas que são possíveis em sistemas modelos seriam difíceis ou antiéticas em humanos, tais descobertas têm muitas implicações práticas. A *genômica comparada* tornou-se uma ciência poderosa, associando evolução e bioquímica.

Sequências do genoma codificam proteínas e padrões de expressão

A estrutura do DNA revelou como a informação é armazenada na sequência de bases ao longo da fita de DNA. Mas qual é a informação armazenada e como esta informação é expressa? O papel mais fundamental do DNA é codificar as sequências das proteínas. Como o DNA, as proteínas são polímeros lineares. No entanto, as proteínas diferem do DNA em duas características importantes: primeiramente, as proteínas são constituídas por 20 unidades fundamentais, chamadas de *aminoácidos*, em vez de apenas quatro, como no DNA. A complexidade química dada por esta variedade de unidades fundamentais permite que as proteínas desempenhem uma grande variedade de funções. Em segundo lugar, as proteínas espontaneamente se enovelam em estruturas tridimensionais elaboradas, determinadas apenas em função de suas sequências de aminoácidos (Figura 1.19). Exploramos em detalhes como soluções contendo duas fitas de DNA se unem para formar uma solução com moléculas em dupla hélice. Um processo semelhante e espontâneo de enovelamento das proteínas confere a elas sua estrutura tridimensional. Um equilíbrio entre as pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de van der Waals superam a perda de entropia causada pela transformação de um conjunto de proteínas disforme em um conjunto de uniforme de moléculas enoveladas e organizadas. As proteínas e seu enovelamento serão discutidos em detalhes no Capítulo 2.

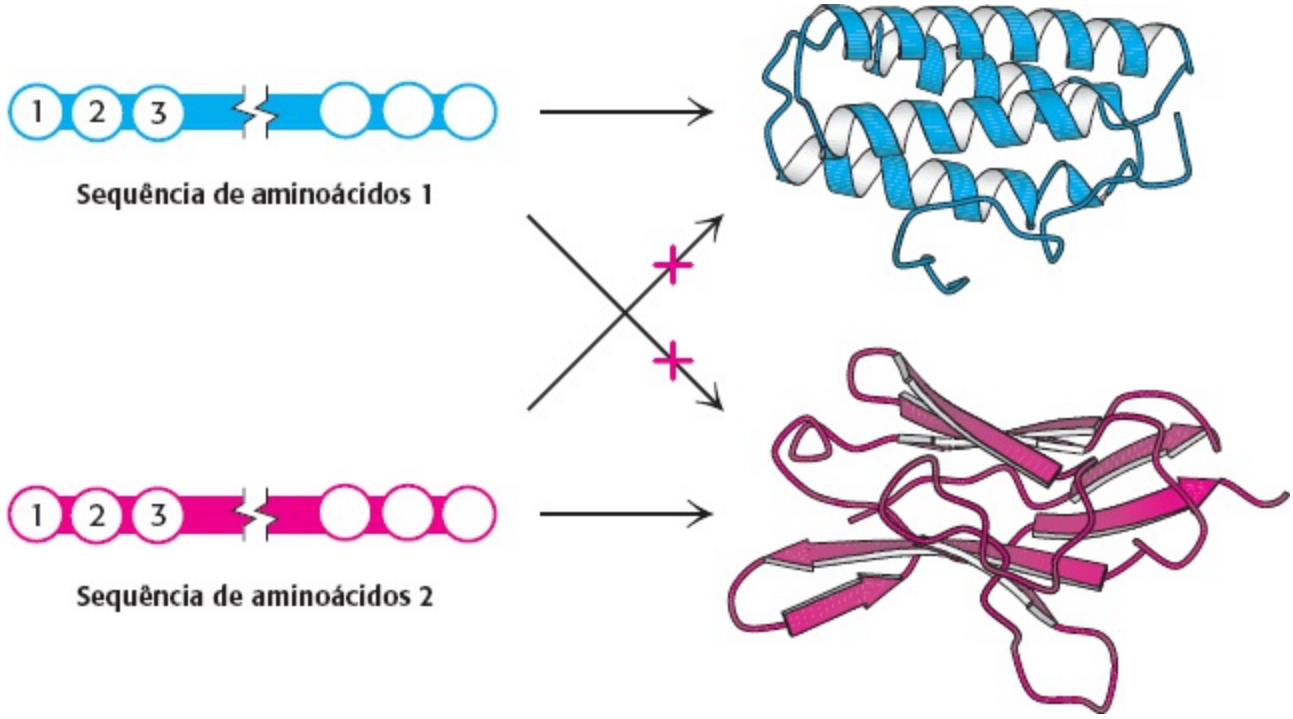


Figura 1.19 Enovelamento de proteínas. Proteínas são polímeros lineares de aminoácidos que se enovelam em estruturas elaboradas. A sequência de aminoácidos determina a estrutura tridimensional. Deste modo, a sequência de aminoácidos 1 dá origem apenas à proteína com sua forma representada em azul, *não* à forma representada em vermelho.

À medida que aumenta o nosso conhecimento sobre as complexidades da genética e da genômica, torna-se cada vez mais difícil definir precisamente a unidade fundamental da informação hereditária, o *gene*. Os genes de definição mais simples codificam sequências de proteínas. Nestes casos de genes codificadores de proteínas, um bloco de bases de DNA codifica a sequência de aminoácidos para uma molécula específica de proteína. Um conjunto de três bases ao longo do filamento de DNA, chamado de *códon*, determina a identidade do aminoácido da sequência da proteína. A relação que liga a sequência de DNA à proteína codificada é chamada de *código genético*. Uma das maiores surpresas do sequenciamento do genoma humano foi o pequeno número de genes codificadores de proteínas. Antes de o projeto de sequenciamento do genoma começar, o consenso era de que o genoma humano incluiria aproximadamente 100.000 genes codificadores de proteínas. A análise atual sugere que o número real gira em torno de 20.000 a 25.000. Utilizaremos uma estimativa de 23.000 ao longo deste livro. Entretanto, mecanismos adicionais permitem que muitos genes codifiquem mais de uma proteína. Por exemplo, a informação genética em alguns genes pode ser traduzida em mais de uma maneira, produzindo um conjunto de proteínas que difere em partes de suas sequências de aminoácidos. Em outros casos, as proteínas são modificadas após sua síntese, por meio da adição de grupos químicos acessórios. Por intermédio destes mecanismos indiretos, nossos genomas codificam uma complexidade muito maior do que a que seria esperada quando consideramos isoladamente o número de genes codificadores de proteínas.

Com base em nosso conhecimento atual, as regiões codificantes de proteínas são responsáveis por apenas 3% do genoma humano. Qual a função do resto do DNA? Alguns contêm informações que regulam a expressão de genes específicos (*i.e.*, a produção de proteínas específicas) em células e condições fisiológicas particulares. Essencialmente, todas as células de um organismo contêm o mesmo genoma, ainda que tipos celulares difiram consideravelmente nas proteínas que produzem. Por exemplo, a hemoglobina é expressa apenas em precursores das hemácias, mesmo que os genes

que codificam para a hemoglobina estejam presentes em essencialmente todas as células. Conjuntos específicos de genes são expressos em resposta a hormônios, ainda que, nas mesmas células, estes genes não sejam expressos na ausência de hormônios. As regiões de controle que regulam tais diferenças são responsáveis apenas por uma pequena quantidade do restante dos nossos genomas. A verdade é que nós ainda não entendemos a função de grande parte do DNA restante. Parte dele aparenta ser "lixo", fragmentos de DNA que foram inseridos em algum ponto da evolução e permaneceram. Em alguns casos, este DNA pode, na verdade, servir para funções importantes. Em outros pode não ter função alguma, mas, como não causa prejuízo significativo, permaneceu no DNA.

A individualidade depende da interação entre os genes e o ambiente

Com a exceção dos gêmeos monozigóticos ("idênticos"), cada pessoa tem uma sequência única de pares de base do DNA. Quão diferentes somos uns dos outros no nível genômico? Uma análise de variação entre os genomas revela que, em média, cada par de indivíduos diferentes tem uma base posicionada diferentemente a cada 200 bases; ou seja, a diferença é de aproximadamente 0,5%. Esta variação de pessoa para pessoa é consideravelmente substancial, comparada com diferenças entre populações. A diferença média entre duas pessoas dentro de um mesmo grupo étnico é maior que a diferença das médias entre dois grupos étnicos diferentes.

O sentido de boa parte desta variação genética não é compreendido. Como mencionado anteriormente, a variação de uma simples base no genoma pode levar a doenças como a anemia falciforme. Pesquisadores têm identificado a variação genética associada a centenas de doenças para as quais a causa pode ser rastreada a um simples gene. Para outras doenças e características, sabemos que a variação em muitos genes diferentes contribui de maneira significativa e frequentemente complexa. Muitos das doenças mais prevalentes dos seres humanos, como as cardíacas, estão associadas a variações em muitos genes. Além disso, na maioria dos casos, a ocorrência de uma variação em particular, ou um conjunto de variações, não causa inevitavelmente uma doença: leva, entretanto, a uma *predisposição* ao desenvolvimento da doença.

Além das diferenças genéticas, os *fatores epigenéticos* são importantes. Estes fatores estão associados ao genoma, mas não estão simplesmente representados na sequência de DNA. Por exemplo, as consequências de parte desta variação genética dependem, geralmente de maneira marcante, se esta sequência atípica de genes foi herdada da mãe ou do pai. Este fenômeno, conhecido como *imprinting genético*, depende da modificação covalente do DNA, particularmente a adição de grupos metila a bases específicas. A epigenética é uma área ativa de pesquisa e muitas descobertas novas podem ser esperadas nesta área.

Embora nosso arcabouço genético e suas características epigenéticas associadas sejam fatores importantes que contribuem para a suscetibilidade às doenças e outras características, fatores do ambiente do indivíduo também são importantes. Quais são estes fatores ambientais? Talvez os mais óbvios sejam as substâncias químicas que comemos ou às quais somos expostos de alguma maneira. O adágio "você é o que você come" tem grande validade; ele se aplica tanto às substâncias que comemos em quantidades significativas quanto às que ingerimos em pequenas quantidades. Ao longo do nosso estudo da bioquímica, encontraremos *vitaminas, micronutrientes* e seus derivados, que têm funções cruciais em muitos processos. Em muitos casos, as funções destas substâncias químicas foram inicialmente descobertas pelas pesquisas das *doenças carenciais* observadas nas pessoas que

não ingeriram quantidades suficientes de uma vitamina ou micronutriente em particular. Apesar de a maioria das vitaminas e micronutrientes ser conhecida há um bom tempo, novas funções destes fatores dietéticos continuam a ser descobertos.

Uma dieta saudável exige um equilíbrio entre os grupos alimentares principais (Figura 1.20). Além de fornecer vitaminas e micronutrientes, os alimentos fornecem calorias na forma de substâncias que podem ser quebradas liberando energia para guiar outros processos bioquímicos. Proteínas, gorduras e carboidratos fornecem as unidades de construção utilizados na formação das moléculas vitais. Os seres humanos evoluíram sob circunstâncias nas quais o alimento, particularmente alimento rico como a carne, era escasso. Com o desenvolvimento da agricultura e das economias modernas, os alimentos ricos são hoje fartos em muitas partes do planeta. Algumas das doenças mais prevalentes nos ditos países desenvolvidos, como a doença cardíaca e o diabetes, podem ser atribuídas às grandes quantidades de gorduras e carboidratos presentes nas dietas modernas. Estamos agora aprofundando a compreensão das consequências bioquímicas destas dietas e da relação entre a dieta e os fatores genéticos.

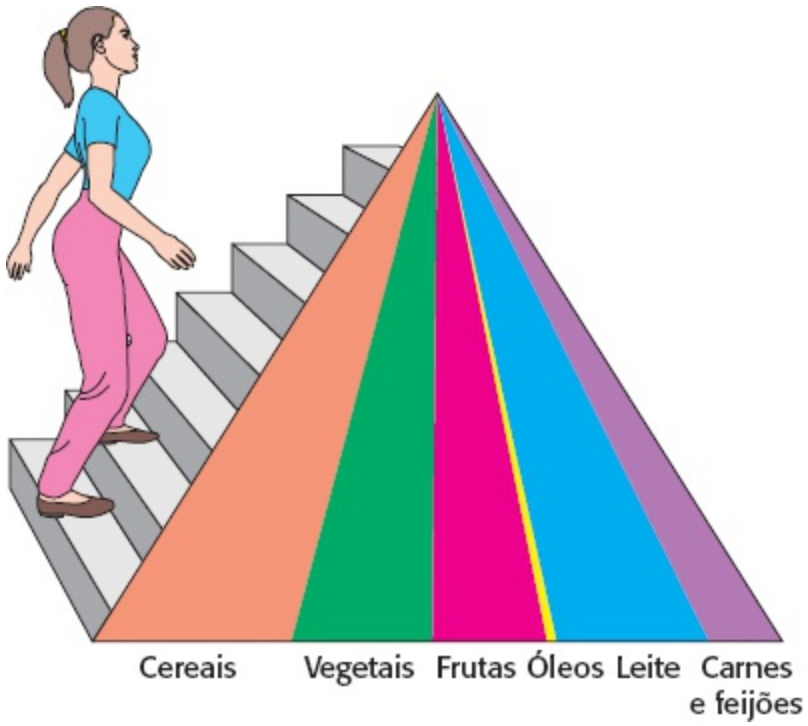


Figura 1.20 Pirâmide alimentar. Uma dieta saudável inclui o equilíbrio entre os grupos alimentares para suprir um número apropriado de calorias e substratos bioquímicos. [Cortesia do U.S. Department of Agriculture.]

As substâncias químicas são apenas uma classe importante de fatores ambientais. Nosso comportamento também tem consequências bioquímicas. Por meio da atividade física, consumimos as calorias que ingerimos, assegurando um equilíbrio apropriado entre a ingestão alimentar e o gasto energético. Atividades físicas, variando do exercício às respostas emocionais, como o medo e o amor, podem ativar vias bioquímicas específicas, levando a modificações nos níveis da expressão gênica, liberação de hormônios e outras consequências. Por exemplo, descobertas recentes revelam que altos níveis de estresse estão associados ao encurtamento dos telômeros, estruturas localizadas nas extremidades dos cromossomos. Além disso, a relação entre a bioquímica e o comportamento é bidirecional. Assim como a bioquímica é afetada por nosso comportamento, o nosso comportamento também é influenciado, ainda que não completamente determinado, por nosso arcabouço genético e

outros aspectos de nossa bioquímica. Tem se tentado associar fatores genéticos a uma gama de características comportamentais.

Assim como as deficiências vitamínicas e as doenças genéticas revelaram princípios fundamentais da bioquímica e da biologia, pesquisas de variações no comportamento e sua relação com fatores genéticos e bioquímicos são fontes potenciais de grandes ideias sobre os mecanismos do cérebro. Por exemplo, pesquisas de drogadição têm revelado circuitos neurais e vias bioquímicas que influenciam fortemente aspectos do comportamento. Desvendar a relação entre a biologia e o comportamento é um dos grandes desafios da ciência moderna, e a bioquímica está fornecendo alguns dos conceitos e ferramentas mais importantes para esta empreitada.

Apêndice | Visualização das estruturas moleculares 1: pequenas moléculas

Os autores de um livro-texto de bioquímica encaram o problema de tentar representar moléculas tridimensionais na forma bidimensional disponível na página impressa. A relação entre as estruturas tridimensionais das biomoléculas e suas funções biológicas será discutida extensamente ao longo deste livro. Em função disso, faremos uso frequente de representações que, embora sejam impressas em duas dimensões por questões de necessidade, enfatizam a estrutura tridimensional das moléculas.

Representações estereoquímicas

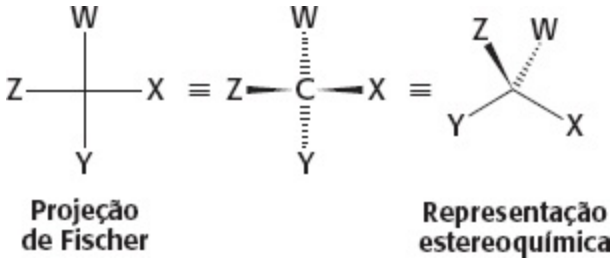
A maioria das fórmulas químicas neste livro é delineada da maneira mais acurada possível, para demonstrar a organização geométrica dos átomos, cruciais para as ligações e reatividade químicas. Por exemplo, o átomo de carbono no metano é tetraédrico, com os ângulos do H–C–H de 109,5°, enquanto o átomo de carbono no formaldeído tem ângulos de ligação de 120°.

Metano Formaldeído

Para ilustrar a *estereoquímica* correta dos carbonos tetraédricos, cunhas serão utilizadas para representar a direção de uma ligação para dentro ou fora do plano da página. Uma cunha sólida, com a extremidade larga distante do carbono, representa uma ligação que se aproxima do leitor, fora do plano. Uma cunha tracejada, com sua extremidade larga próxima ao átomo de carbono, representa uma ligação distante do leitor, atrás do plano da página. As duas ligações restantes são representadas como linhas retas.

Representações de Fischer

Embora representem a estrutura verdadeira de um composto, as estruturas estereoquímicas são geralmente difíceis de desenhar rapidamente. Um método alternativo menos representativo das estruturas com um centro de carbono tetraédrico se baseia no uso das *projeções de Fischer*.



Em uma projeção de Fischer, as ligações com o carbono central são representadas por linhas horizontais e verticais dos átomos substitutivos para o átomo de carbono, o qual se assume estar no centro da cruz. Por convenção, assume-se que as ligações horizontais se projetam para fora da página, em direção ao leitor, enquanto as ligações verticais afastam-se do leitor.

Modelos moleculares de pequenas moléculas

Para representar a arquitetura molecular de pequenas moléculas em detalhes, dois tipos de modelos serão geralmente utilizados: compacto e esferas e bastões. Estes modelos exibem as estruturas no nível atômico.

1. *Modelos de preenchimento espacial*. Os modelos de preenchimento espacial são os mais realistas. O tamanho e a posição de um átomo em um modelo de preenchimento espacial são determinados pelas suas propriedades de ligação e pelo raio van der Waals, ou pela distância de contato. O raio van der Waals descreve o quanto dois átomos podem se aproximar um do outro quando eles não estão ligados covalentemente. As cores do modelo são estabelecidas por convenção.

Carbono, preto Hidrogênio, branco Nitrogênio, azul Oxigênio, vermelho Enxofre, amarelo Fósforo, violeta

Modelos de preenchimento espacial de diversas moléculas simples são exibidos na Figura 1.21.

2. *Modelos em esferas e bastões.* Modelos em esferas e bastões não são tão realísticos quanto os modelos de preenchimento espacial, porque os átomos são representados como esferas de raios menores que seus raios de van der Waals. No entanto, a organização das ligações é mais facilmente visível, uma vez que as ligações são explicitamente representadas como bastões. Em uma ilustração, o estreitamento do bastão, representando paralaxe, informa qual par de átomos ligados está mais próximo do leitor. Um modelo esfera e bastão mostra uma estrutura complexa mais claramente do que o modelo de preenchimento espacial. Modelos em esfera e bastão de várias moléculas simples estão demonstrados na Figura 1.21.

Modelos moleculares para representar grandes moléculas serão discutidos no apêndice do Capítulo 2.

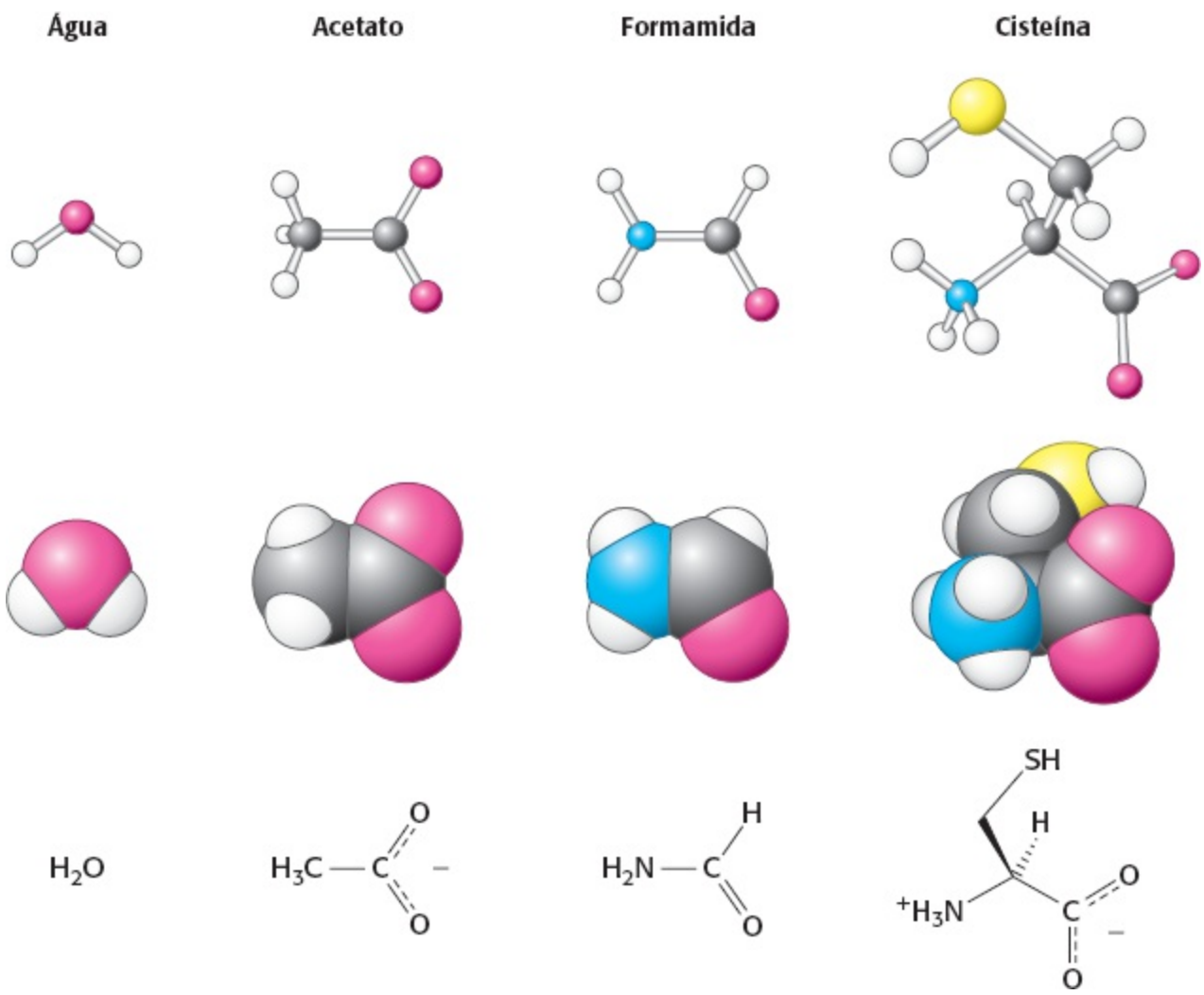


Figura 1.21 Representações moleculares. Estão representadas as fórmulas estruturais (embaixo), modelos em esfera e bastão (meio) e representações compactas (topo) de moléculas selecionadas. Preto = carbono, vermelho = oxigênio, branco = hidrogênio, amarelo = enxofre, azul = nitrogênio.

Palavras-chave

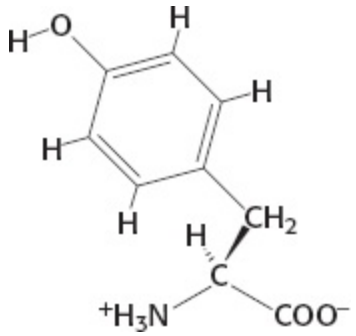
ácido desoxirribonucleico (DNA) (p. 4)
Archaea (p. 5)
aminoácido (p. 20)
Bacteria (p. 5)
código genético (p. 21)
dupla hélice (p. 7)
efeito hidrofóbico (p. 11)
energia livre (energia livre de Gibbs) (p. 14)
entalpia (p. 13)
entropia (p. 13)
estrutura de ressonância (p. 9)
eucarionte (p. 5)
Eukaria (p. 5)
interação de van der Waals (p. 10)
interação eletrostática (p. 9)
interação hidrofóbica (p. 12)
ligação covalente (p. 7)
macromolécula biológica (p. 4)
metabólito (p. 4)

pH (p. 15)
ponte de hidrogênio (p. 10)
predisposição (p. 22)
procarionte (p. 5)
proteína (p. 4)
tampão (p. 17)
valor de pK_a (p. 17)

Questões

1. *Doadores e aceptores*. Identifique os doadores e aceptores de pontes de hidrogênio em cada uma das quatro bases da página 6.

2. *Estruturas de ressonância*. A estrutura de um aminoácido, tirosina, é mostrada a seguir. Desenhe uma estrutura de ressonância alternativa.



3. *Tipos de ligação*. Quais tipos de ligação não covalente mantêm unidos os compostos sólidos que se seguem?

a) Sal de cozinha (NaCl), que contém íons de Na^+ e Cl^-.

b) Grafite (C), que é constituído por camadas de carbonos covalentemente ligadas.

4. *Não infrinja a lei*. Considerando os valores de alterações de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS), quais dos seguintes processos ocorrerão a 298 K sem violar a Segunda Lei da Termodinâmica?

a) $\Delta H = -84$ kJ mol^{-1} (-20 kcal mol^{-1})
$\Delta S = +125$ J mol^{-1} K^{-1} ($+30$ cal mol^{-1} K^{-1})

b) $\Delta H = -84$ kJ mol^{-1} (-20 kcal mol^{-1})
$\Delta S = -125$ J mol^{-1} K^{-1} ($+30$ cal mol^{-1} K^{-1})

c) $\Delta H = +84$ kJ mol^{-1} ($+20$ kcal mol^{-1})
$\Delta S = -125$ J mol^{-1} K^{-1} ($+30$ cal mol^{-1} K^{-1})

d) $\Delta H = +84$ kJ mol^{-1} ($+20$ kcal mol^{-1})
$\Delta S = -125$ J mol^{-1} K^{-1} (-30 cal mol^{-1} K^{-1})

5. *Entropia de formação da dupla hélice*. Para a formação da dupla hélice, ΔG pode ser medido em -54 kJ mol^{-1} (-13 kcal mol^{-1}) em pH 7,0 em 1 M NaCl a 25°C (298 K). O calor liberado indica uma mudança de entalpia de -251 kJ mol^{-1} (-60 kcal mol^{-1}). Para este processo, calcule a mudança na entropia do sistema e a mudança de entropia da vizinhança.

6. *Encontre o pH*. Quais são os valores de pH das soluções que se seguem?

a) 0,1 M HCl

b) 0,1 M NaOH

c) 0,05 M HCl

d) 0,05 M NaOH

7. *Um ácido fraco*. Qual o pH de uma solução a 0,1 M de ácido acético ($pK_a = 4,75$)

(Dica: Considere x a concentração de íons H^+ liberados pelo ácido acético ao dissociar-se. As soluções para uma equação quadrática da forma $ax^2 + bx + c = 0$ são $x = (-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}) / 2a.$)

8. *Efeitos substitutivos*. Qual o pH de uma solução 0,1 M de ácido cloroacético ($ClCH_2COOH$, $pK_a = 2,86$)?

9. *Fato básico*. Qual é o pH de uma solução de etilamina, uma vez que o pK_a do íon etilamônio ($CH_3CH_2NH_3^+$) é 10,70?

10. *Comparação*. Uma solução aquosa é preparada por meio da adição de 0,01 M de ácido acético, 0,01 M de etilamina e ajustando-se o pH para 7,4. Qual é a razão de acetato para ácido acético? Qual a razão de etilamina para o íon etilamônio?

11. *Concentrado.* O ácido acético é adicionado à água até que o pH atinja 4,0. Qual a concentração total do ácido acético adicionado?

12. *Diluição*. 100 ml de uma solução de ácido clorídrico com pH 5,0 foi diluída para 1 l. Qual é o pH da solução diluída?

13. *Diluição de tampão*. 100 ml de uma solução tampão a 0,1 mM de ácido acético e acetato de sódio com pH 5,0 foi diluída para 1 l. Qual é o H da solução diluída?

14. *Encontre o pKa.* Para um ácido HA, as concentrações de HA e A^- são de 0,075 e 0,025, respectivamente, em pH 6,0. Qual é o valor de pK_a para o HA?

15. *Indicador de pH.* Um corante que é um ácido e tem cores diferentes em sua forma protonada e desprotonada pode ser utilizado como um indicador de pH. Suponha que você tenha uma solução 0,001 M de um corante com um pK_a de 7,2. Pela cor, a concentração da forma protonada é 0,0002 M. Considere que o restante do corante está em sua forma desprotonada. Qual é o pH da solução?

16. *Qual é a razão?* Um ácido com um pK_a de 8,0 está presente em uma solução de pH 6,0. Qual a razão das formas protonadas e desprotonadas do ácido?

17. *Tampão fosfato*. Qual a razão das concentrações de $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-} em a) pH 7,0; b) pH 7,5; c) pH 8,0?

18. *Capacidade de tamponamento*. Duas soluções de acetato de sódio são preparadas, uma com a concentração de 0,1 M e a outra com a concentração de 0,01 M. Calcule os valores de pH quando as seguintes concentrações de HCl forem adicionadas a cada uma destas soluções: 0,0025 M; 0,005 M; 0,01 M e 0,05 M.

19. *Preparação de tampão*. Você deseja preparar um tampão que consiste em ácido acético e acetato de sódio com um total de ácido acético e concentração de acetato de 250 mM e pH de 5,0. Quais são as concentrações de ácido acético e acetato de sódio que você deve usar? Pressupondo que você deseja preparar 2 l desse tampão, quantos moles de ácido acético e de acetato de sódio serão necessários? Quantos gramas de cada você precisará (pesos moleculares: ácido acético 60,05 g mol^{-1}, acetato de sódio 82,03 g mol^{-1})?

20. *Uma abordagem alternativa*. Quando você vai preparar o tampão descrito na Questão 19, você descobre que não há acetato de sódio em seu laboratório. Todavia, há hidróxido de sódio. Quanto (em moles e gramas) de ácido acético e hidróxido de sódio é necessário para preparar o tampão?

21. *Mais uma opção*. Seu amigo de outro laboratório não tem ácido acético, então ele tenta preparar o tampão da Questão 19 dissolvendo 41,02 g de acetato de sódio em água, adicionando cuidadosamente 180,0 ml de HCl a 1 M e adicionando mais água de modo a atingir um volume total de 2 *l*. Qual é a concentração total de acetato mais ácido acético na solução? Essa solução terá pH 5,0? Será idêntica ao tampão desejado? Se não for, qual é a diferença?

22. *Substituto do sangue*. Como foi mostrado neste capítulo, o sangue contém uma concentração total de fosfato de aproximadamente 1 mM e, tipicamente, tem um pH de 7,4. Você deseja preparar 100 *l* de tampão fosfato com pH de 7,4 a partir de NaH_2PO_4 (peso molecular, 119,98 g mol^{-1}) e Na_2HPO_4 (peso molecular, 141,96 g mol^{-1}). Quanto de cada (em gramas) é necessário?

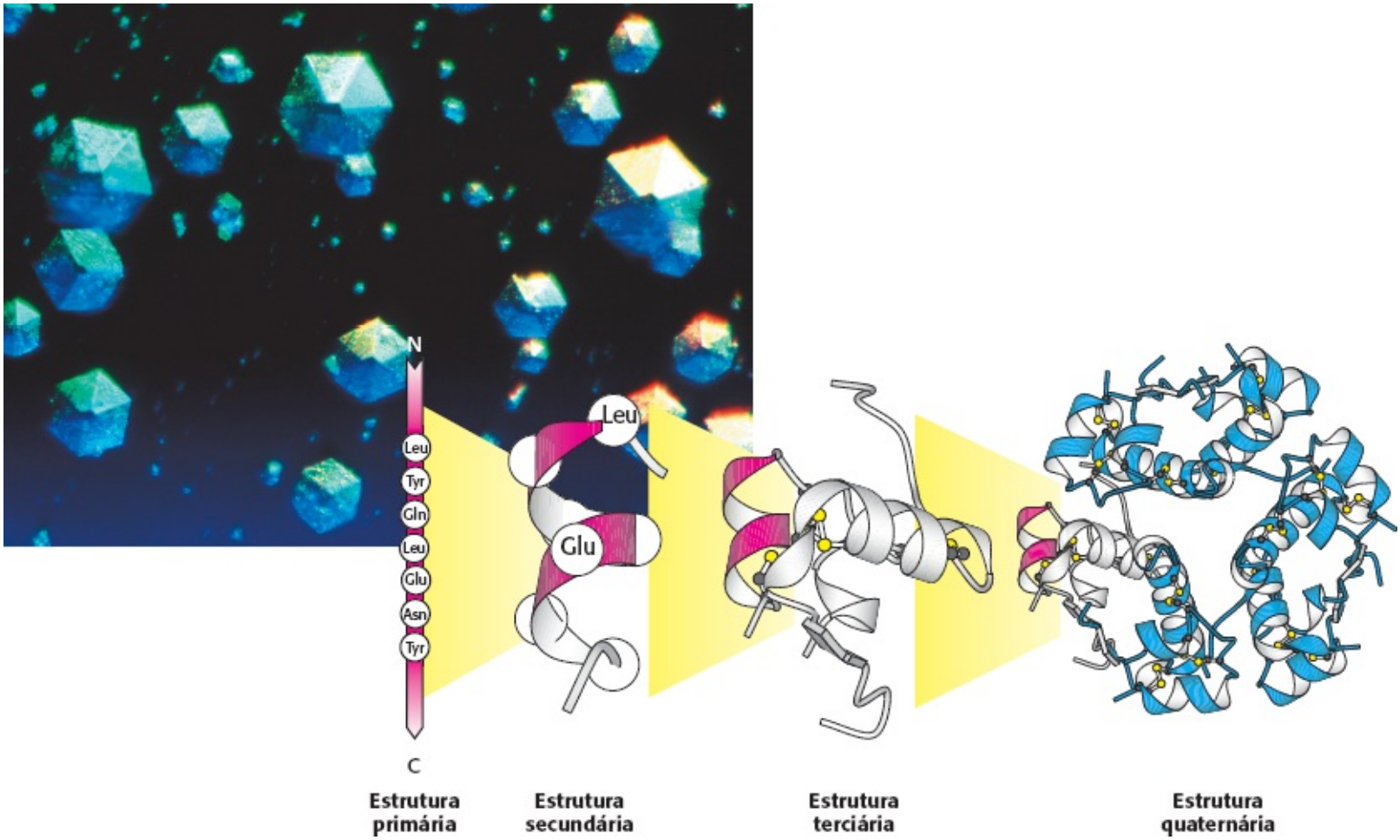
23. *Um problema potencial*. Você deseja preparar um tampão com pH 7,0. Você combina 0,060 grama de ácido acético e 14,59 gramas de acetato de sódio e acrescenta água até um volume total de 1 *l*. Qual é o pH? Esse será o tampão de pH 7,0 desejado?

24. *Carga*! Suponha que dois grupamentos fosfato no DNA (cada um com uma carga elétrica de –1) estejam separados por 12 angstrons. Qual é a energia da interação eletrostática entre esses dois fosfatos se for considerada uma constante dielétrica de 80? Repita o cálculo com uma constante dielétrica de 2.

25. Viva a diferença. Na média, quantas diferenças de base existem entre dois seres humanos?

Estrutura e Composição das Proteínas

2



Cristais de insulina humana. A insulina é um hormônio proteico, fundamental para a manutenção da glicemia em níveis apropriados. (Abaixo) Cadeias de aminoácidos em uma sequência específica (a estrutura primária) determinam uma proteína como a insulina. Estas cadeias se enovelam em estruturas bem definidas (a estrutura terciária) – neste caso, uma molécula única de insulina. Tais estruturas se unem a outras cadeias para formar conjuntos como o complexo de seis moléculas de insulina mostrado na extremidade direita (a estrutura quaternária). Estes conjuntos geralmente podem ser induzidos a formar cristais bem definidos (fotografia à esquerda), o que permite uma determinação detalhada destas estruturas. [Fotografia de Alfred Pasieka/Photo Researchers.]

SUMÁRIO

2.1 As proteínas são construídas a partir de um repertório de 20 aminoácidos

2.2 Estrutura primária | Os aminoácidos são unidos por ligações peptídicas para formar cadeias polipeptídicas

2.3 Estrutura secundária | As cadeias polipeptídicas podem se enovelar em estruturas regulares como a alfahélice, a folha beta, voltas e alças

2.4 Estrutura terciária | As proteínas hidrossolúveis enovelam-se em estruturas compactas com núcleos apolares

2.5 Estrutura quaternária | As cadeias polipeptídicas podem se unir formando estruturas com múltiplas

subunidades

2.6 A sequência de aminoácidos de uma proteína determina sua estrutura tridimensional

As proteínas são as macromoléculas mais versáteis nos sistemas vivos; elas têm funções cruciais em essencialmente todos os processos biológicos. As proteínas funcionam como catalisadores e transportadores e armazenam outras moléculas como o oxigênio, fornecem suporte mecânico e proteção imunológica, geram movimento, transmitem impulsos nervosos e controlam o crescimento e a diferenciação. Grande parte deste livro se concentrará nas funções das proteínas e em como elas realizam tais funções.

Muitas propriedades fundamentais permitem que as proteínas participem em uma grande gama de funções.

1. *As proteínas são polímeros lineares construídos a partir de unidades monoméricas chamadas de aminoácidos*, os quais são unidos ponta a ponta. A sequência dos aminoácidos ligados uns aos outros é chamada de estrutura primária. De maneira notável, as proteínas se dobram espontaneamente em estruturas tridimensionais, determinadas pela sequência de aminoácidos no polímero proteico. A estrutura tridimensional formada pelas pontes de hidrogênio entre os aminoácidos próximos uns dos outros é chamada de estrutura secundária, enquanto a estrutura terciária é formada por interações de longa distância entre os aminoácidos. A função da proteína depende diretamente desta estrutura tridimensional (Figura 2.1). Portanto, *as proteínas são a personificação da transição de um mundo unidimensional de sequências para um mundo tridimensional de moléculas capazes de realizar diversas funções*. Muitas proteínas têm estruturas quaternárias, em que a proteína funcional é composta por várias cadeias polipeptídicas.

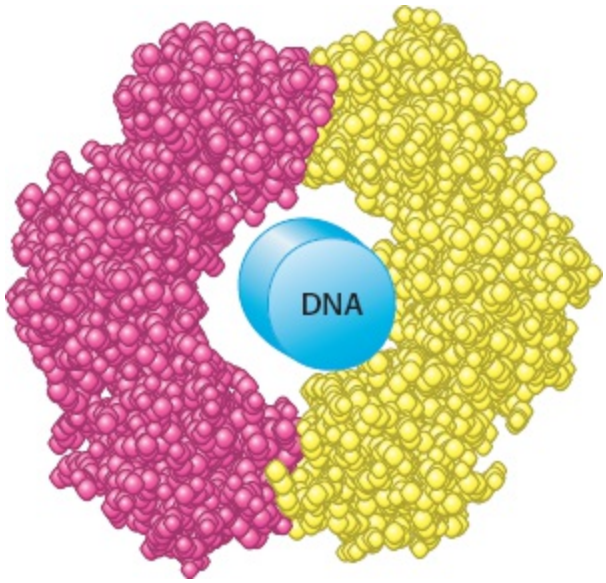


Figura 2.1 A estrutura determina a função. Um componente proteico da máquina de replicação do DNA circunda uma parte da dupla hélice de DNA, representado como um cilindro. A proteína, que é composta por duas subunidades idênticas (mostradas em vermelho e amarelo), age como uma braçadeira que permite que grandes segmentos de DNA sejam copiados sem que a maquinário de replicação se dissocie do DNA. [Desenhada a partir de 2POL.pdb.]

2. *As proteínas têm ampla variedade de grupos funcionais*. Estes grupos funcionais incluem alcoóis, tióis, tioésteres, ácidos carboxílicos, carboxamidas e uma variedade de grupos básicos. A maior parte destes grupos é quimicamente reativa. Quando combinado em várias sequências, este conjunto

de grupos funcionais é responsável pelo amplo espectro de funções das proteínas. Por exemplo, suas propriedades reativas são essenciais às funções das enzimas, as proteínas que catalisam reações químicas específicas nos sistemas biológicos (Capítulos 8 a 10).

3. *As proteínas podem interagir umas com as outras e com outras macromoléculas biológicas para formar complexos proteicos.* As proteínas nestes complexos podem agir sinergisticamente tendo propriedades que as proteínas individualmente podem não ter (Figura 2.2). Exemplos destes complexos incluem as máquinas macromoleculares que replicam o DNA, transmitem sinais dentro das células e executam muitos outros processos essenciais.

4. *Algumas proteínas são bem rígidas, enquanto outras exibem considerável flexibilidade.* As unidades rígidas podem funcionar como elementos estruturais no citoesqueleto (o arcabouço interno das células) ou no tecido conectivo. As proteínas com alguma flexibilidade podem funcionar como dobradiças, molas ou alavancas que são cruciais para a função proteica, para a união de proteínas umas às outras e a outras moléculas, formando unidades complexas, e para a transmissão de informações dentro das células e entre elas (Figura 2.3).

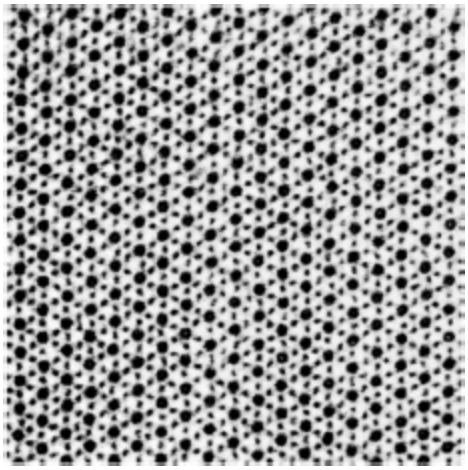


Figura 2.2 Organização proteica complexa. Uma micrografia eletrônica de um tecido entômico de voo, em seção transversal, mostra um padrão hexagonal de dois tipos de filamentos proteicos. [Cortesia do Dr. Michael Reedy.]

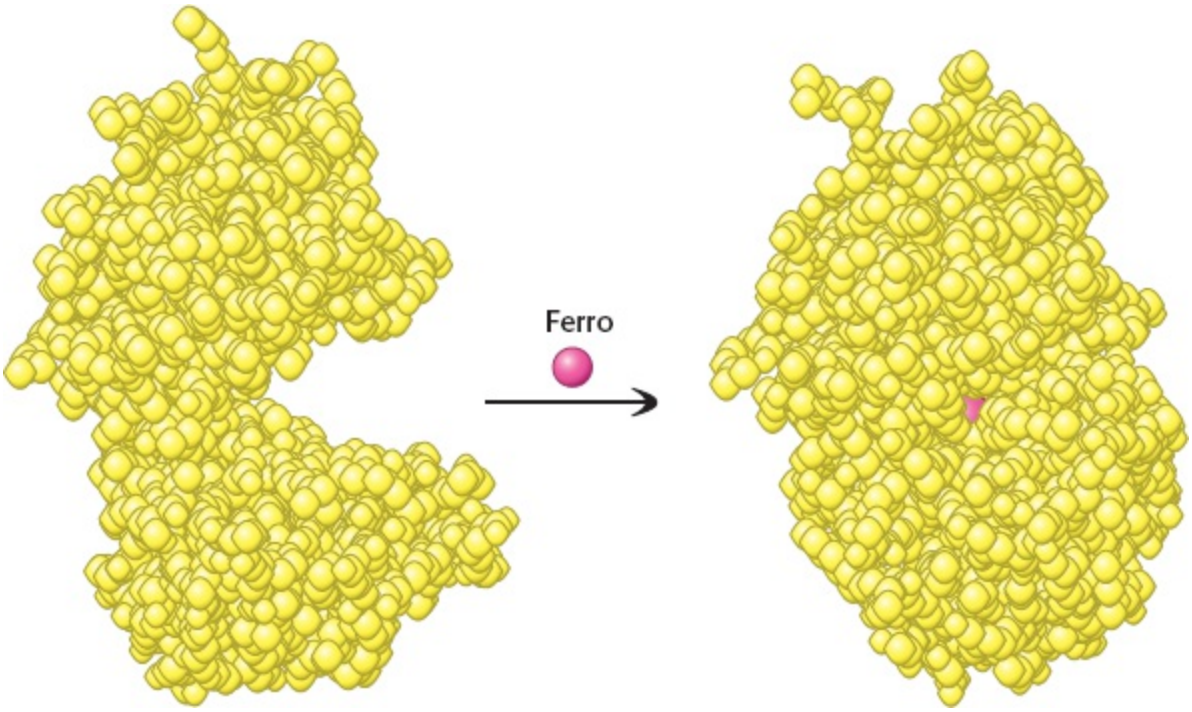


Figura 2.3 Flexibilidade e função. Ao se ligar com o ferro, a proteína lactoferrina sofre uma mudança conformacional substancial, que permite que outras moléculas distinguam entre as formas ligada e não ligada ao ferro. [Desenhada a partir de 1 LFH.pdb e 1 LFG.pdb.]

Nota para distinguir estereoisômeros

Aos quatro substituintes diferentes de um átomo de carbono assimétrico é atribuída uma prioridade, de acordo com o número atômico. O substituinte de menor prioridade, em geral o hidrogênio, aponta para longe do leitor. A configuração do átomo de carbono será chamada de *S* (do latim *sinister*, esquerda) se a progressão da maior para a menor prioridade for no sentido anti-horário. A configuração será chamada de *R* (do latim *rectus*, direita) se a progressão for no sentido horário.

2.1 As proteínas são construídas a partir de um repertório de 20 aminoácidos

Os aminoácidos são as unidades estruturais básicas das proteínas. Um α-*aminoácido* consiste em um átomo central de carbono, chamado de *carbono* α, ligado a um grupo amino, um ácido carboxílico, um átomo de hidrogênio e um grupo R diferenciado. Geralmente refere-se ao grupo R como a *cadeia lateral*. Com quatro grupos diferentes ligados ao átomo de carbono tetraédrico, os α-aminoácidos são *quirais*: eles podem existir em uma de duas formas de imagem especular, chamadas de isômeros L e D (Figura 2.4).

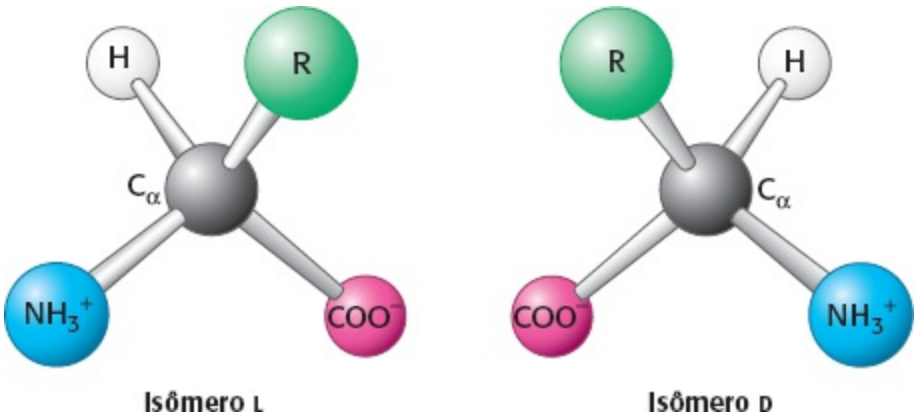


Figura 2.4 Isômeros L e D dos aminoácido. A letra R refere-se à cadeia lateral. Os isômero L e D são formas de imagem especular.

Apenas os aminoácidos L constituem as proteínas. Para quase todos os aminoácidos, o isômero L tem configuração absoluta *S* (em vez de *R*) (Figura 2.5). Qual o fundamento para a preferência para os aminoácidos L? A resposta não é conhecida, mas há evidências de que os aminoácidos L são ligeiramente mais solúveis que do que uma mistura racêmica de aminoácidos D e L, que tende a formar cristais. Esta pequena diferença na solubilidade pode ter sido amplificada ao longo do tempo, de modo que os isômeros L se tornaram dominantes em soluções.

Em pH neutro os aminoácidos existem predominantemente como íons dipolares (também conhecidos como *zwitterions*). Na forma dipolar, o grupo amino está protonado ($—NH_3^+$) e o grupo carboxila, desprotonado ($–COO^-$). O estado de ionização de um aminoácido varia com o pH (Figura 2.6). Em solução ácida (p.ex., pH 1), o grupo amino está protonado ($–NH_3^+$) e o grupo carboxila não está dissociado (–COOH). À medida que o pH aumenta, o ácido carboxílico é o primeiro grupo a perder um próton, desde que seu pK_a esteja próximo de 2. A forma dipolar persiste até que o pH se

aproxime de 9, quando o grupo amino protonado perde um próton.

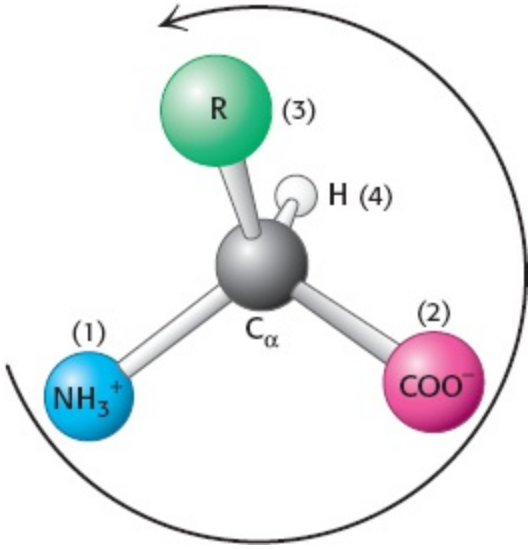


Figura 2.5 Apenas aminoácidos L são encontrados nas proteínas. Quase todos os aminoácidos L têm uma configuração absoluta *S*. A direção anti-horária da flecha, dos substituintes de maior para menor prioridade, indica que o centro quiral tem configuração *S*.

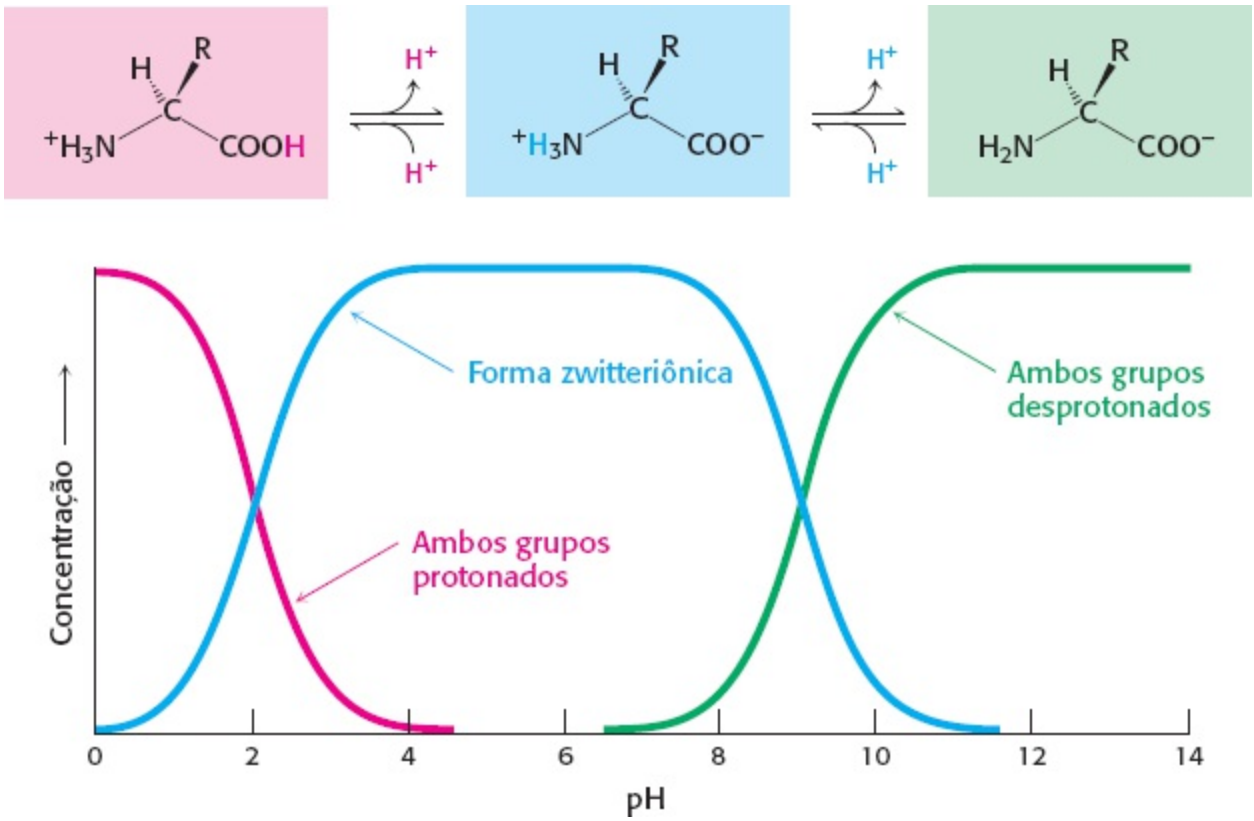


Figura 2.6 Estado de ionização em função do pH. O estado de ionização dos aminoácidos é alterado por uma variação no pH. A forma zwitteriônica predomina próximo ao pH fisiológico.

Vinte tipos de cadeias laterais, variando em *tamanho, forma, carga, capacidade de ligar hidrogênio, caráter hidrofóbico e reatividade química* são comumente encontrados em proteínas. Na verdade, todas as proteínas em todas as espécies – bactérias, arquea e eucariotas – são construídas a partir do mesmo conjunto de 20 aminoácidos com apenas algumas exceções. Este alfabeto fundamental para a construção de proteínas tem muitos bilhões de anos de idade. A notável gama de funções mediada pelas proteínas deriva da diversidade e versatilidade destas 20 unidades

estruturais. O estudo do uso deste alfabeto para criar as estruturas tridimensionais complexas, que permitem que as proteínas executem tantos processos biológicos, constitui uma excitante área da bioquímica, à qual retornaremos na Seção 2.6.

Embora haja muitas maneiras de classificar os aminoácidos, agruparemos estas moléculas em quatro grupos, de acordo com as características químicas gerais de seus grupos R:

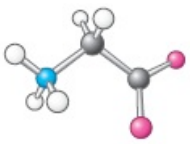
1. Aminoácidos hidrofóbicos com grupos R apolares
2. Aminoácidos polares com grupos R neutros, com a carga distribuída de maneira desigual
3. Aminoácidos carregados positivamente, com grupos R que têm carga positiva em pH fisiológico
4. Aminoácidos carregados negativamente, com grupos R que têm carga negativa em pH fisiológico

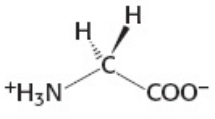
Aminoácidos hidrofóbicos. O aminoácido mais simples é a *glicina*, que tem apenas um átomo de hidrogênio como cadeia lateral. Com dois átomos de hidrogênio ligados ao carbono α, a glicina é o único aminoácido *aquiral*. A *alanina*, o segundo aminoácido mais simples, tem um grupo metila (—CH_3) como cadeira lateral (Figura 2.7).

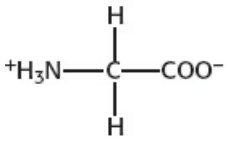
Cadeias laterais maiores hidrocarbonadas são encontradas na *valina, leucina e isoleucina*. A *metionina* tem uma cadeia lateral altamente alifática, que inclui um grupo tioéter (—S—). A cadeia lateral da isoleucina inclui um centro quiral adicional; apenas o isômero exibido na Figura 2.7 é encontrado em proteínas. As cadeias laterais alifáticas maiores são especialmente hidrofóbicas; isto é, elas tendem a se agrupar entre si, em vez de com a água. As estruturas tridimensionais das proteínas hidrossolúveis são estabilizadas por esta tendência dos grupos hidrofóbicos de se associarem mutuamente, o que é conhecido como *efeito hidrofóbico* (Capítulo 1). Os diferentes tamanhos e formas destas cadeias laterais hidrocarbonadas permitem que elas se associem para formar estruturas compactas com pouco espaço vazio. A *prolina* também tem uma cadeia lateral alifática, mas se diferencia dos demais 20 membros do conjunto de aminoácidos porque sua cadeia lateral é ligada tanto ao átomo de nitrogênio quanto ao carbono α. A prolina influencia consideravelmente a arquitetura das proteínas, uma vez que seu anel estrutural a torna mais conformacionalmente restrita que os demais aminoácidos.

Dois aminoácidos com *cadeias laterais aromáticas* relativamente simples fazem parte do repertório fundamental. A *fenilalanina*, como o nome indica, contém um anel fenílico no lugar de um dos átomos de hidrogênio da alanina. O *triptofano* tem um grupo indol ligado a um grupo metileno (—CH_2—); o grupo indol é constituído pela fusão de dois anéis contendo um grupo NH. A fenilalanina é puramente hidrofóbica, enquanto o triptofano é menos, por conta de seus grupos NH.

Glicina
(Gly, G)

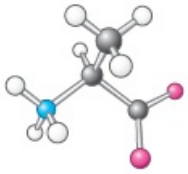


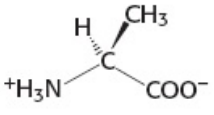


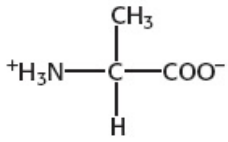


Glicina
(Gly, G)

Alanina
(Ala, A)

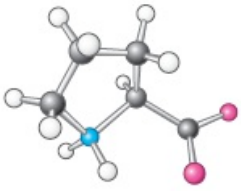


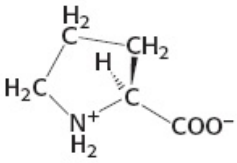


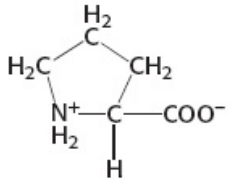


Alanina
(Ala, A)

Prolina
(Pro, P)

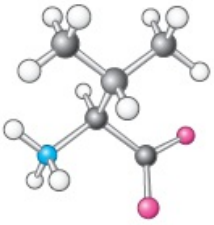


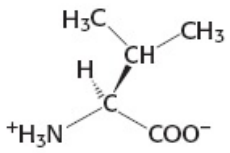


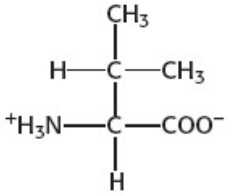


Prolina
(Pro, P)

Valina
(Val, V)

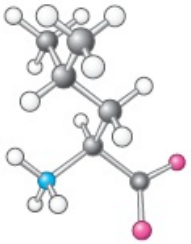


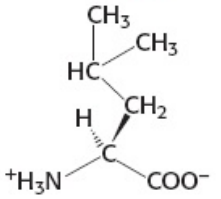


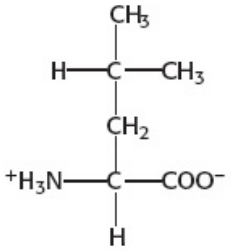


Valina
(Val, V)

Leucina
(Leu, L)

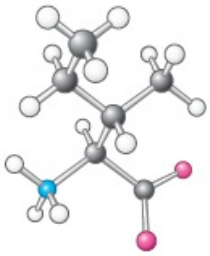


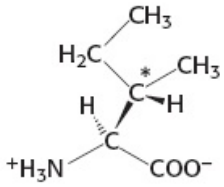


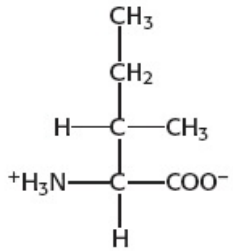


Leucina
(Leu, L)

Isoleucina
(Ile, I)

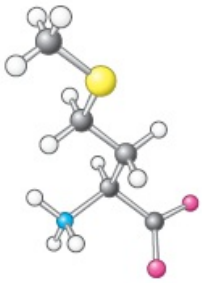


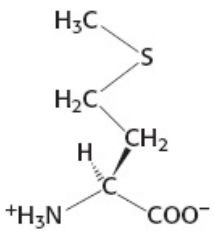


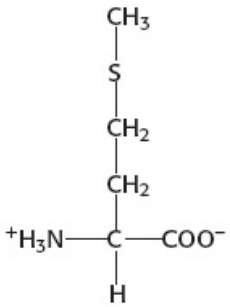


Isoleucina
(Ile, I)

Metionina
(Met, M)

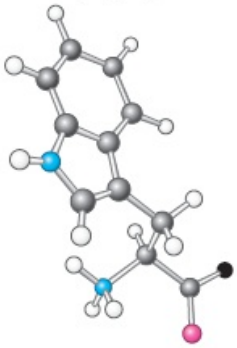


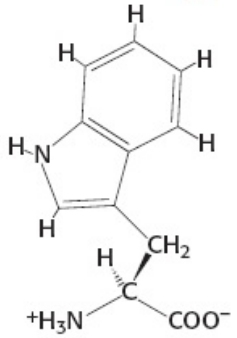


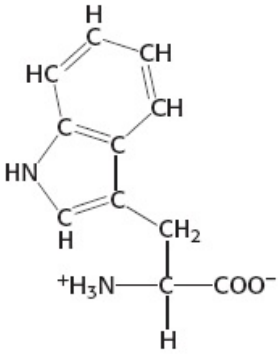


Metionina
(Met, M)

Triptofano
(Trp, W)

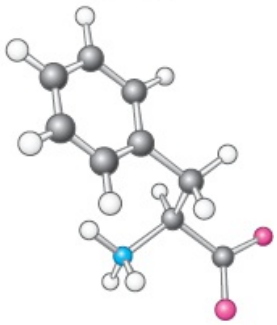


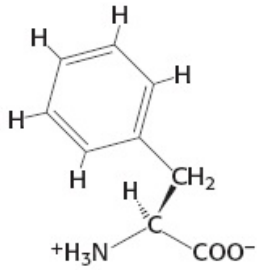


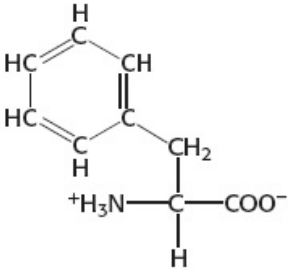


Triptofano
(Trp, W)

Fenilalanina
(Phe, F)

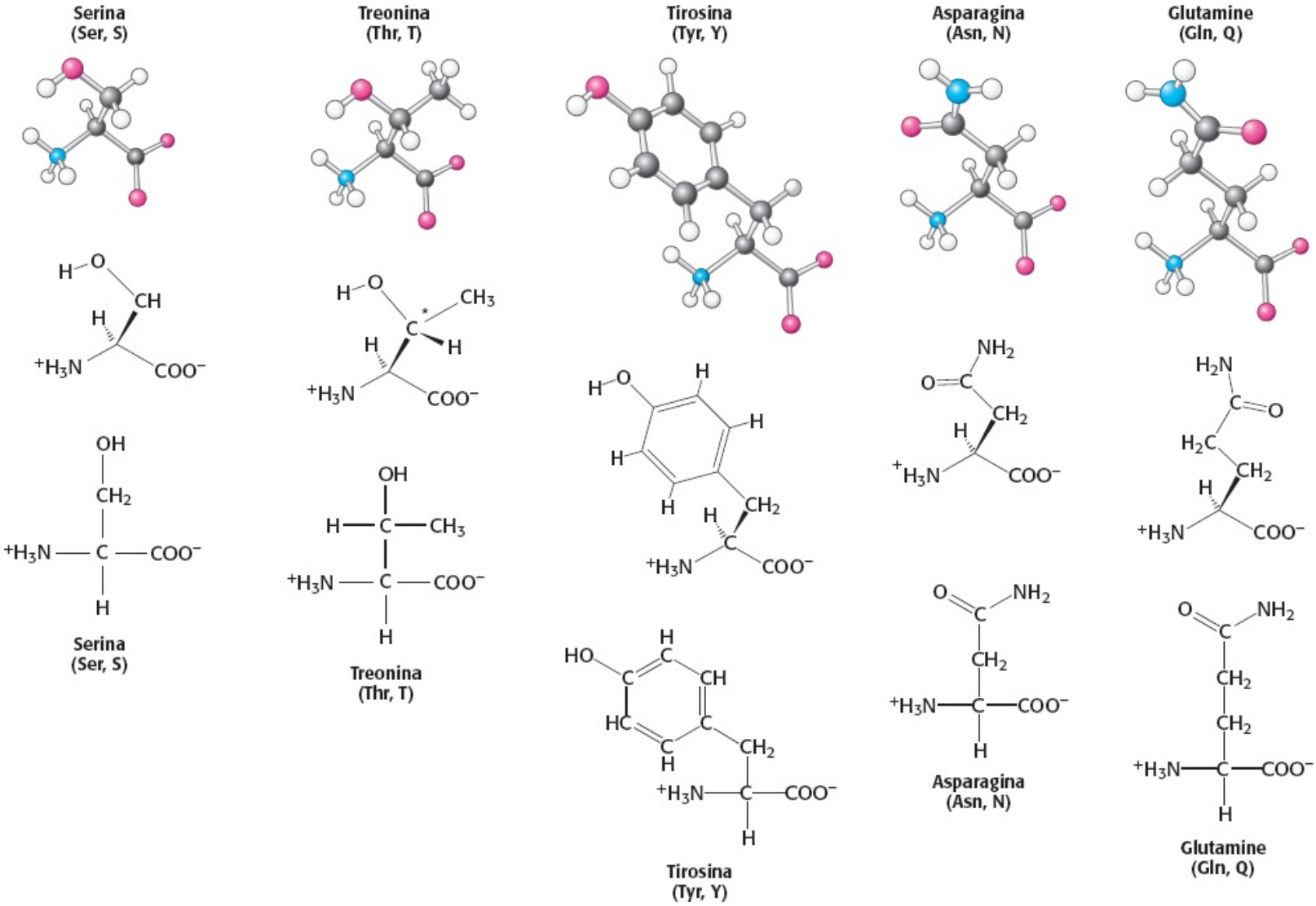






Fenilalanina
(Phe, F)

Figura 2.7 Estruturas dos aminoácidos hidrofóbicos. Para cada aminoácido, um modelo em esfera e bastão (topo) mostra a organização dos átomos e ligações no espaço. Representações estereoquímicas realistas (meio) mostram a organização geométrica das ligações em torno dos átomos, e a projeção de Fischer (embaixo) mostra todas as ligações como perpendiculares, representadas de modo simplificado (ver o Apêndice do Capítulo 1).



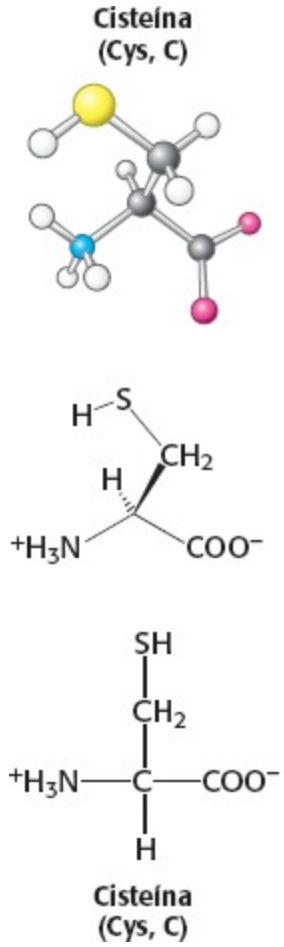


Figura 2.8 Estruturas dos aminoácidos polares. O centro quiral adicional da treonina está indicado com um asterisco.

Aminoácidos polares. Seis aminoácidos são polares, mas sem carga. Três aminoácidos, *serina, treonina e tirosina,* têm grupos hidroxila (—OH) ligados a uma cadeia lateral hidrofóbica (Figura 2.8). A serina pode ser considerada uma versão da alanina ligada a um grupo hidroxila; a treonina se assemelha à valina com um grupo hidroxila no lugar de um grupo metila; e a tirosina é uma versão da fenilalanina com um grupo hidroxila substituindo um átomo de hidrogênio no anel aromático. O grupo hidroxila faz com que estes aminoácidos sejam muito mais *hidrofílicos* ("amantes da água") e *reativos* que seus análogos hidrofóbicos. A treonina, como a isoleucina, contém um centro assimétrico adicional; mais uma vez, apenas um isômero está presente nas proteínas.

Além disso, este grupo inclui a *asparagina* e a *glutamina,* derivados sem carga dos aminoácidos ácidos aspartato e glutamato (Figura 2.11). Cada um desses aminoácidos contém uma *carboxamida* terminal no lugar de um ácido carboxílico. A cadeia lateral da glutamina é um grupo metileno maior que a da asparagina.

A *cisteína* é estruturalmente semelhante à serina, mas contém um grupo *sulfidrila, ou tiol* (—SH), no lugar do grupo hidroxila (—OH). O grupo sulfidrila é muito mais reativo. Pares de grupos sulfidrila podem se juntar para formar pontes dissulfeto, que são particularmente importantes na estabilização de algumas proteínas, como será discutido adiante.

Aminoácidos carregados positivamente. Agora nos voltamos aos aminoácidos com cargas positivas completas, que os tornam altamente hidrofílicos. A *lisina* e a *arginina* têm cadeias laterais longas que terminam com grupos que são *positivamente carregados* em pH neutro. A lisina tem uma amina primária em uma extremidade e a arginina, um grupo guanidínio. A *histidina* contém um grupo

imidazol, um anel aromático que também pode estar carregado positivamente (Figura 2.9).

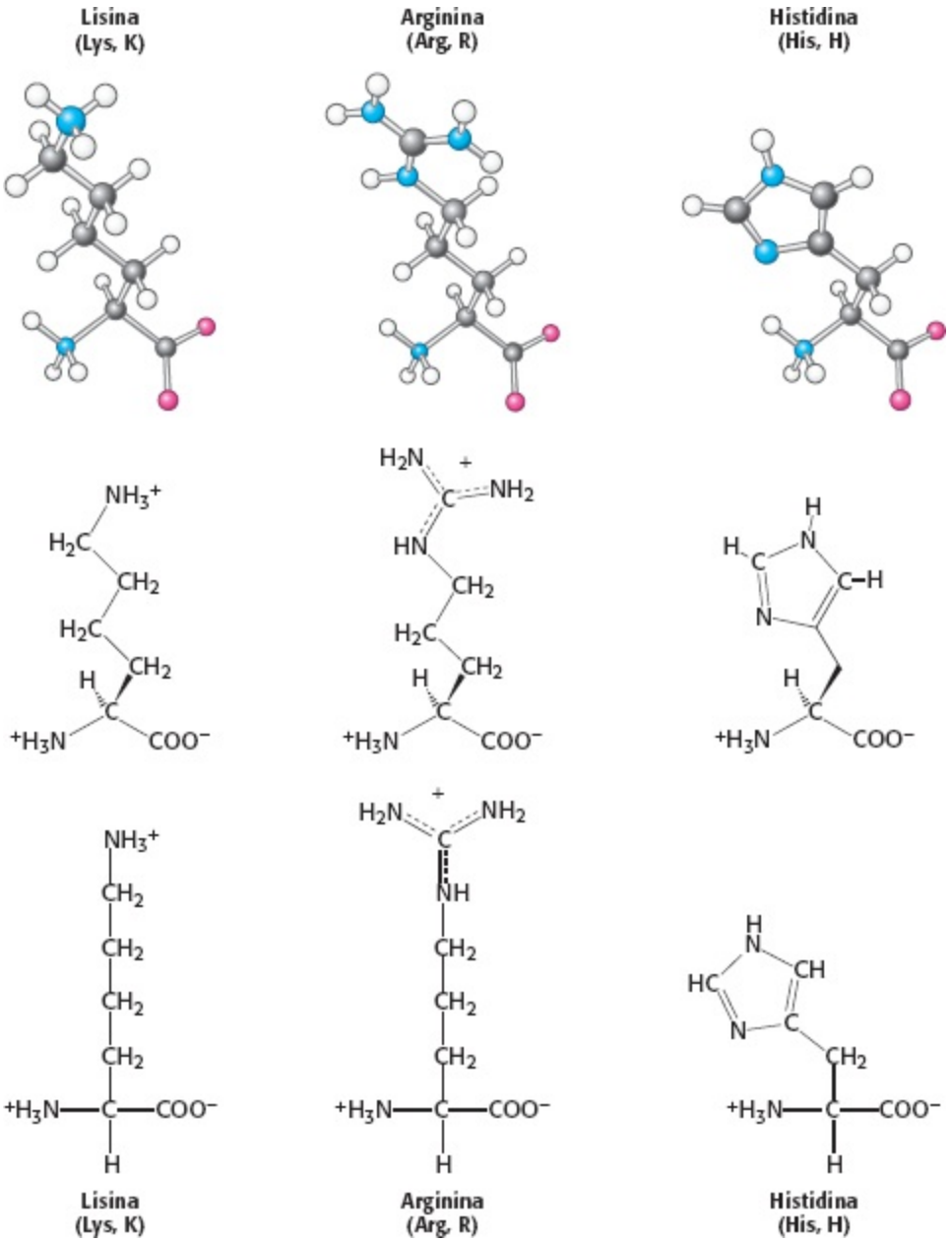
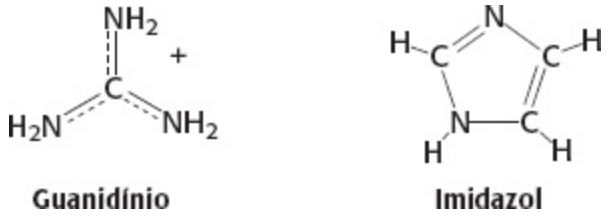


Figura 2.9 Aminoácidos carregados positivamente: lisina, arginina e histidina.

Com um pK_a próximo de 6, o grupo imidazol pode estar sem carga ou com carga positiva próximo a um pH neutro, de acordo com o ambiente local (Figura 2.10). A histidina é geralmente encontrada nos sítios ativos das enzimas, onde o anel imidazólico pode ligar e liberar prótons ao longo do curso das reações enzimáticas.



Aminoácidos carregados negativamente. Este conjunto contém dois aminoácidos com *cadeias laterais ácidas*: ácido aspártico e ácido glutâmico (Figura 2.11). Esses aminoácidos são geralmente chamados de *aspartato* e *glutamato* para enfatizar que, em pH fisiológico, suas cadeias laterais

geralmente não contêm um próton, presente na forma ácida, e têm, portanto, carga negativa. No entanto, em algumas proteínas, estas cadeias laterais aceitam prótons, e esta capacidade é geralmente importante, sob o ponto de vista funcional.

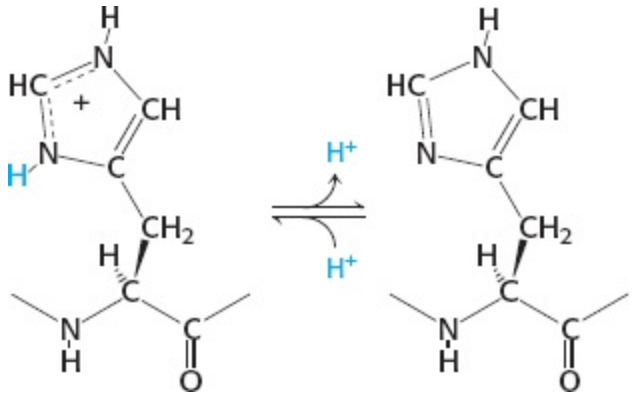


Figura 2.10 Ionização da histidina. A histidina pode ligar ou liberar prótons em pH próximo do fisiológico.

Sete dos 20 aminoácidos têm cadeias laterais prontamente ionizáveis. Estes sete aminoácidos são capazes de doar ou aceitar prótons, tanto para facilitar reações quanto para formar pontes iônicas. A Tabela 2.1 fornece o equilíbrio e os valores típicos de pK_a para a ionização das cadeias laterais da tirosina, cisteína, arginina, lisina, histidina e dos ácidos aspártico e glutâmico nas proteínas. Dois outros grupos proteicos – a amina α terminal e a carboxila α terminal – podem ser ionizados e seus valores típicos de pK_a também foram incluídos na Tabela 2.1.

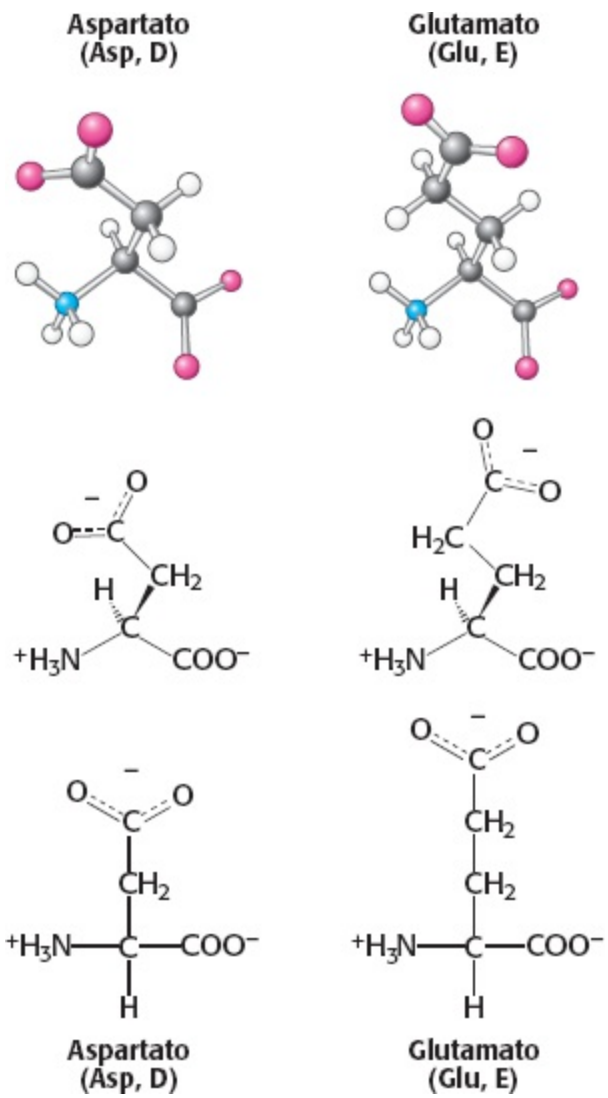
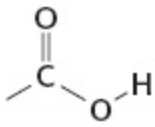
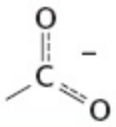
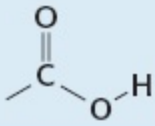
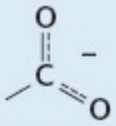
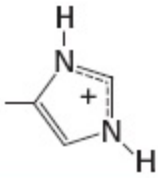
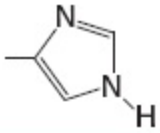
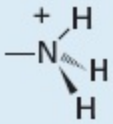
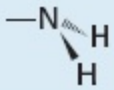
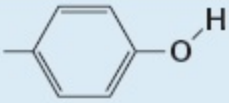
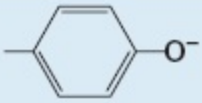
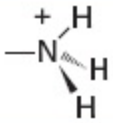
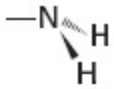
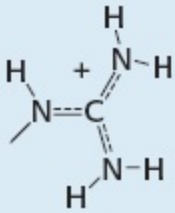
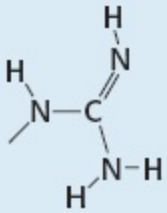


Figura 2.11 Aminoácidos carregados negativamente.

Tabela 2.1 Valores típicos de pK_a de grupos ionizáveis de proteínas.

Grupo	Ácido		Base	pK_a típico*
Carboxila α terminal		⇌		3,1
Ácido aspártico Ácido glutâmico		⇌		4,1
Histidina		⇌		6,0
Amina α terminal		⇌		8,0
Cisteína		⇌		8,3
Tirosina		⇌		10,9
Lisina		⇌		10,8
Arginina		⇌		12,5

*Os valores de pK_a dependem da temperatura, força iônica e do microambiente do grupo ionizável.

Os aminoácidos são geralmente designados por uma abreviação de três letras ou por um símbolo de uma letra (Tabela 2.2). As abreviações para os aminoácidos são as primeiras três letras de seus nomes, exceto para asparagina (Asn), glutamina (Gln), isoleucina (Ile) e triptofano (Trp). Os símbolos de muitos aminoácidos são a primeira letra de seus nomes (p. ex., G para a glicina e L para a leucina); os demais símbolos foram acordados por convenção. Estas abreviações e símbolos são uma constante no vocabulário dos bioquímicos.

Tabela 2.2 Abreviações dos aminoácidos.

Aminoácidos	Abreviação com três letras	Abreviação com uma letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N

Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V
Asparagina ou ácido aspártico	Asx	B
Glutamina ou ácido glutâmico	Glx	Z

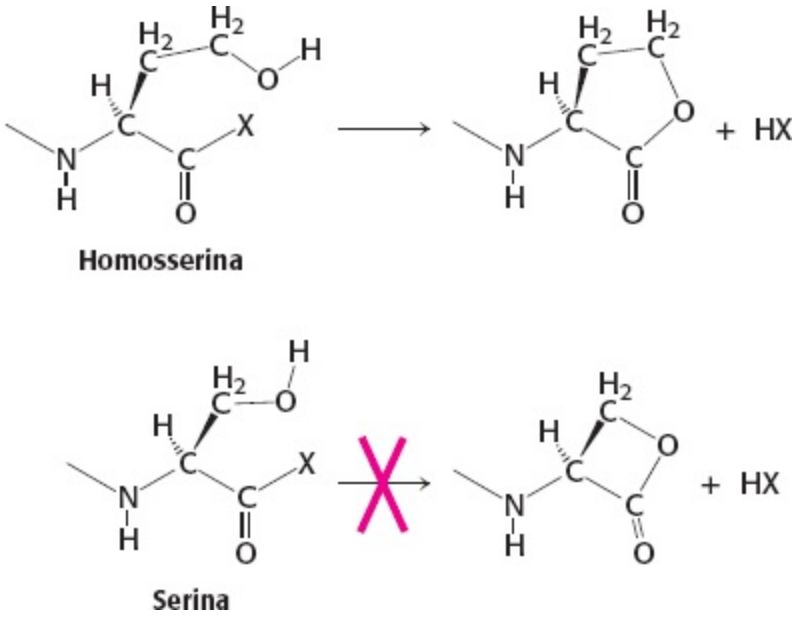


Figura 2.12 Reatividade indesejável nos aminoácidos. Alguns aminoácidos não são adequados às proteínas por conta de ciclizações indesejáveis. A homosserina pode ciclizar formando um anel pentagonal estável, potencialmente resultando na clivagem de uma ligação peptídica. A ciclização da serina formaria um anel tetragonal rígido, sendo desta maneira desfavorável. O X pode ser o grupo amino de um aminoácido vizinho ou outro grupo que pode estar saindo.

Como os aminoácidos deste conjunto específico tornaram-se os blocos de construção das proteínas? Primeiramente, como um conjunto, eles são diversificados: suas propriedades estruturais e químicas são amplas, fornecendo às proteínas a versatilidade para desempenhar muitas funções. Em segundo lugar, muitos destes aminoácidos provavelmente se disponibilizaram a partir de reações prebióticas; ou seja, de reações que ocorreram antes da origem da vida. Finalmente, outros possíveis aminoácidos simplesmente poderiam ser reativos demais. Por exemplo, aminoácidos como homosserina e homocisteína tendem a assumir formas pentagonais cíclicas, que limitam seu uso em proteínas; os aminoácidos alternativos, encontrados nas proteínas – serina e cisteína – não ciclizam prontamente, porque os anéis em suas formas cíclicas são muito pequenos (Figura 2.12).

2.2 Estrutura primária | Os aminoácidos são unidos por ligações peptídicas para formar cadeias polipeptídicas

As proteínas são *polímeros lineares* formados pela ligação do grupo α-carboxila de um aminoácido ao grupo α-amino de outro aminoácido. Este tipo de ligação é chamado de *ligação peptídica* ou *ligação amídica*. A formação de um dipeptídio a partir de dois aminoácidos é acompanhada pela perda de uma molécula de água (Figura 2.13). O equilíbrio desta reação deve-se a hidrólise, em vez da síntese, na maioria das condições. Logo, a biossíntese de pontes peptídicas requer uma fonte de energia livre. No entanto, ligações peptídicas são *cineticamente bem estáveis*, uma vez que a taxa de hidrólise é extremamente lenta; a duração de uma ligação peptídica em solução aquosa, na ausência de um catalisador, aproxima-se de 1.000 anos.

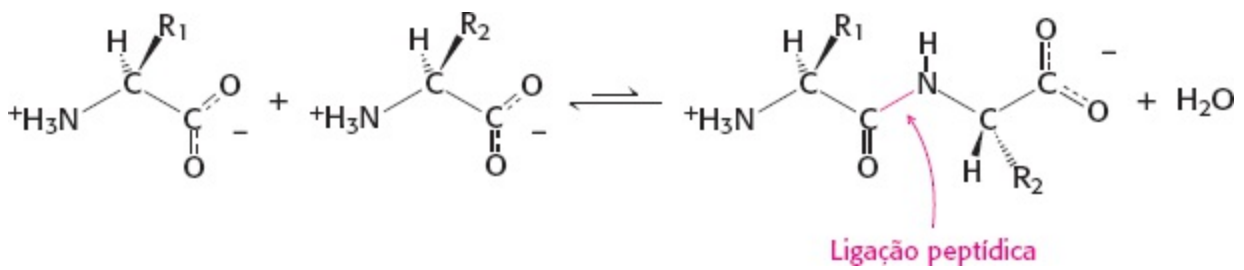


Figura 2.13 Formação da ligação peptídica. A ligação de dois aminoácidos é acompanhada pela perda de uma molécula de água.

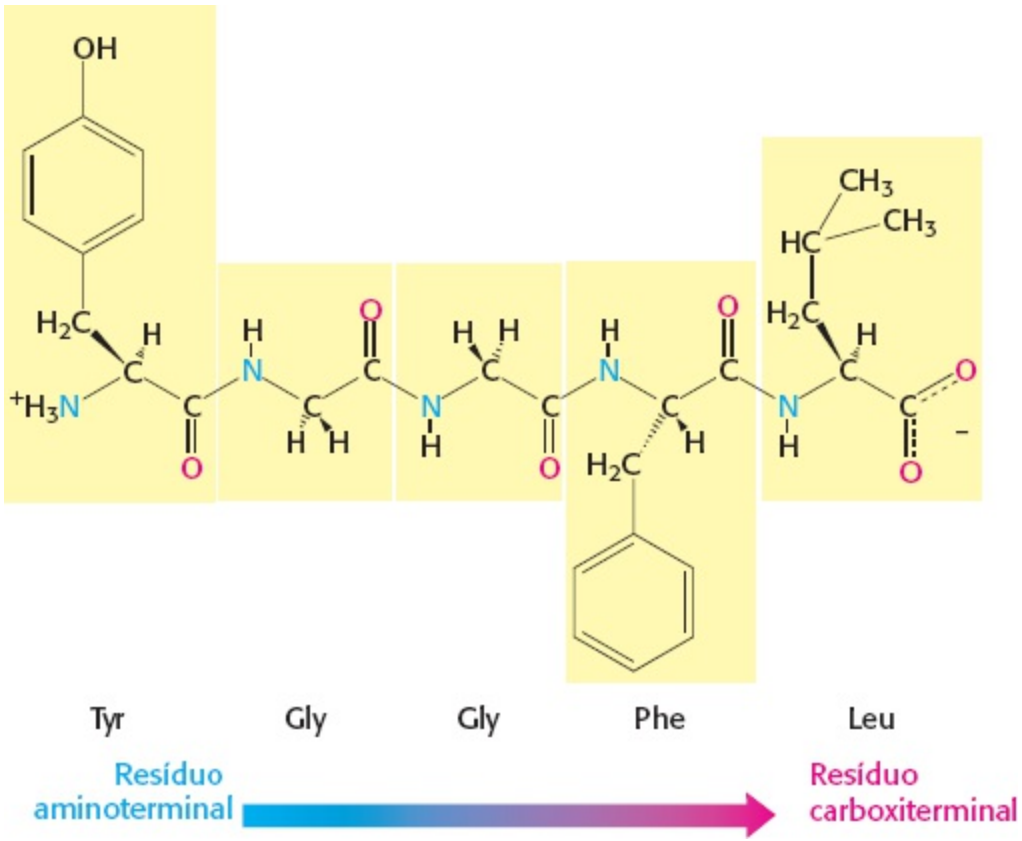


Figura 2.14 As sequências de aminoácidos têm polaridade. Esta ilustração do pentapeptídio Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (YGGFL) mostra a sequência de aminoácidos, da extremidade aminoterminal à carboxiterminal. Este pentapeptídio, Leu-encefalina, é um peptídio opioide que modula a percepção da dor. O pentapeptídio reverso, Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr (LFGGY) é uma molécula diferente e não tem os mesmos efeitos.

Uma sequência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas forma uma *cadeia polipeptídica*, e cada unidade de aminoácido em um polipeptídio é chamada de *resíduo*. Uma *cadeia polipeptídica tem polaridade* porque seus extremidades são diferentes: um grupo α amino está presente em uma extremidade e um grupo α carboxila, na outra. Por convenção, *a extremidade amina é considerada o começo da cadeia polipeptídica*, de modo que a sequência de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica é escrita começando-se pelo resíduo aminoterminal. Assim, no pentapeptídio Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (YGGFL), a tirosina é o resíduo aminoterminal (N-terminal) e a leucina, o resíduo carboxiterminal (C-terminal). Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr (LFGGY) é um pentapeptídio diferente, com propriedades químicas diferentes (Figura 2.14).

Uma cadeia polipeptídica é constituída por uma parte repetitiva regular, chamada de *cadeia principal ou arcabouço*, e uma parte variável, que corresponde às *cadeias laterais* específicas (Figura 2.15). O arcabouço polipeptídico tem alto potencial de formação de pontes de hidrogênio. Cada resíduo contém um grupo carbonil (C=O), que é um bom aceptor de pontes de hidrogênio e, à

exceção da prolina, um grupo NH, que é um bom doador de pontes de hidrogênio. Estes grupos interagem entre si e com grupos funcionais de cadeias laterais para estabilizar estruturas particulares, como será discutido na Seção 2.3.

Dálton
Uma unidade de massa muito semelhante à massa do átomo de hidrogênio. Recebeu este nome em homenagem a John Dalton (1766–1844), que desenvolveu a teoria atômica da matéria.

Quilodálton (kDa)
Uma unidade de massa igual a 1.000 dáltons.

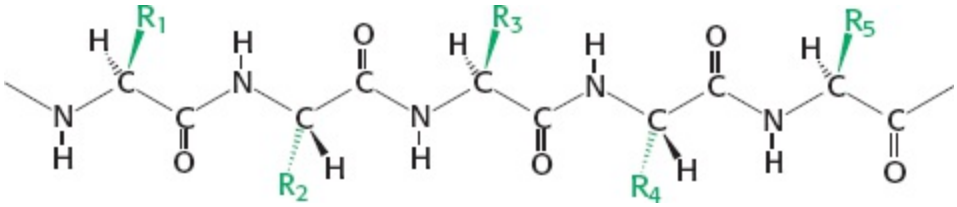


Figura 2.15 Componentes de uma cadeia polipeptídica. Uma cadeia polipeptídica consiste em um arcabouço constante (mostrado em preto) e cadeias laterais variáveis (mostradas em verde).

A maior parte das cadeias polipeptídicas naturais contém entre 50 e 2.000 resíduos de aminoácidos e são comumente chamadas de *proteínas*. A maior proteína conhecida é a proteína muscular *titina*, que consiste em mais de 27.000 aminoácidos. Os peptídios compostos de poucos aminoácidos são chamados de *oligopeptídios* ou simplesmente *peptídios*. O peso molecular médio de um resíduo de aminoácido é de aproximadamente 110 g mol^{-1}, de modo que o peso molecular da maioria das proteínas está entre 5.500 e 220.000 g mol^{-1}. Também podemos nos referir à massa de uma proteína, expressa em unidades de dáltons; um *dálton* é igual a uma unidade de massa atômica. Uma proteína com peso molecular de 50.000 g mol^{-1} tem massa de 50.000 dáltons ou 50 kDa (quilodáltons).

Em algumas proteínas, a cadeia polipeptídica linear é interligada. O tipo mais comum de interligação é a *ponte dissulfeto*, formada pela oxidação de um par de resíduos de cisteína (Figura 2.16). A unidade resultante das duas cisteínas ligadas é chamada de *cistina*. As proteínas extracelulares geralmente têm várias pontes dissulfeto, enquanto as proteínas intracelulares normalmente não as têm. Raramente são encontradas na proteína outras interligações, derivadas de outras cadeias laterais, que não as pontes dissulfeto. Por exemplo, as fibras de colágeno no tecido conectivo são fortalecidas desta maneira, assim como os coágulos sanguíneos de fibrina.

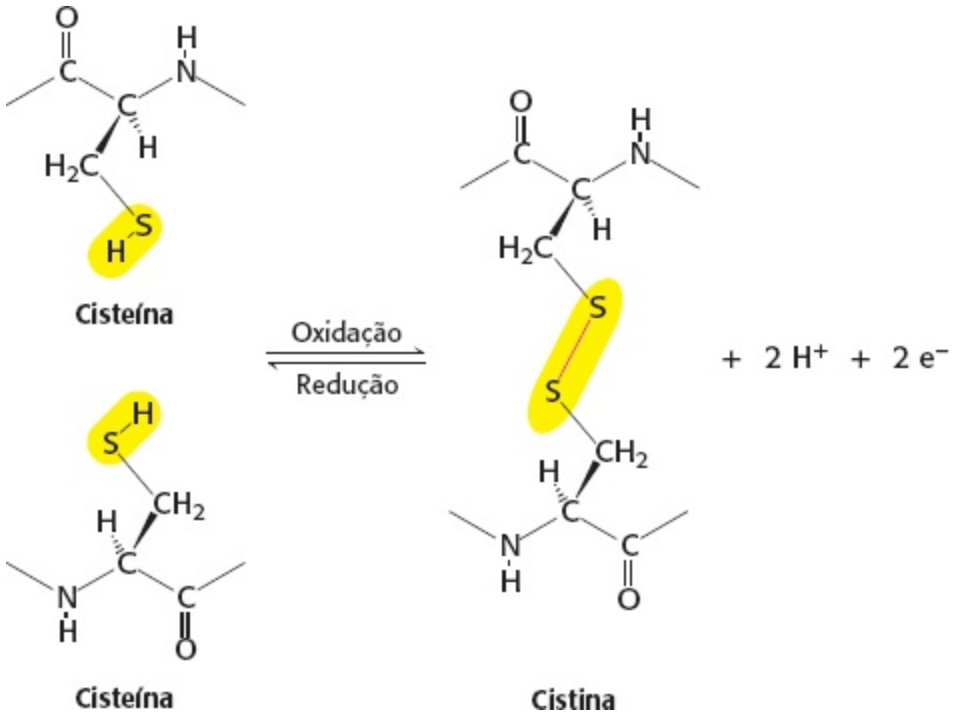


Figura 2.16 Interligações. A formação de uma ponte dissulfeto entre dois resíduos de cisteína é uma reação de oxidação.

As proteínas têm sequências particulares de aminoácidos, especificadas pelos genes

Em 1953, Frederick Sanger estabeleceu a sequência de aminoácidos da insulina, um hormônio proteico (Figura 2.17). *Este trabalho é um marco da bioquímica porque mostrou, pela primeira vez, que uma proteína tem sequência de aminoácidos precisamente estabelecida*, que consiste apenas em aminoácidos L unidos por ligações peptídicas. Este feito estimulou outros pesquisadores a seguir com estudos de sequenciamento de várias outras proteínas. Atualmente, as sequências completas de aminoácidos de mais de 2.000.000 de proteínas são conhecidas. *O fato marcante é que cada proteína tem uma sequência de aminoácidos exclusiva, precisamente definida.* A sequência de aminoácidos de uma proteína é referida como sua *estrutura primária*.

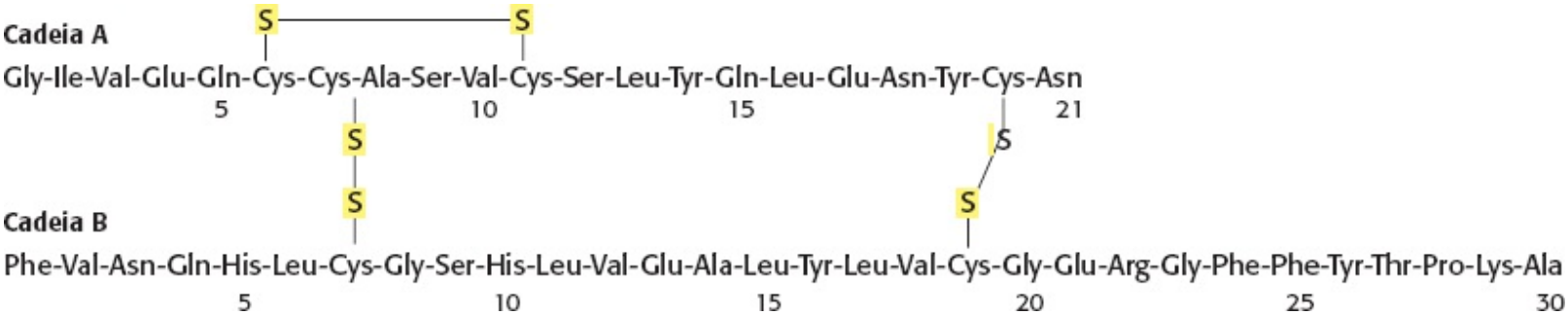


Figura 2.17 Sequência de aminoácidos da insulina bovina.

Uma sequência de pesquisas no fim dos anos de 1950 e no início dos anos de 1960 revelou que as sequências de aminoácidos das proteínas são determinadas pela sequência de nucleotídios dos genes. A sequência de nucleotídios no DNA especifica a sequência complementar de nucleotídios do RNA, que por sua vez especifica a sequência de aminoácidos da proteína. Em particular, cada um dos 20 aminoácidos do repertório é codificado por uma ou mais sequências de três nucleotídios (Seção 5.5).

Conhecer as sequências de aminoácidos é importante por muitos motivos. Primeiramente, o conhecimento da sequência de uma proteína normalmente é essencial à elucidação de seu mecanismo

de ação (p.ex., o mecanismo catalítico de uma enzima). Na verdade, proteínas como novas propriedades podem ser geradas a partir da variação das sequências de proteínas conhecidas. Em segundo lugar, as sequências de aminoácidos determinam as estruturas tridimensionais das proteínas. A sequência de aminoácidos é o elo entre a mensagem genética no DNA e a estrutura tridimensional que realiza a função biológica da proteína. As análises das relações entre as sequências de aminoácidos e as estruturas tridimensionais das proteínas estão desvendando as regras que governam o enovelamento das cadeias polipeptídicas. Em terceiro lugar, a determinação da sequência é um componente da patologia molecular, uma área da medicina em rápida ascensão. Alterações na sequência de aminoácidos podem modificar as funções da proteína e causar patologias. Doenças graves – e às vezes fatais – como anemia falciforme (Capítulo 7) e fibrose cística podem ser causadas por uma mudança em apenas um aminoácido dentro de uma proteína. Em quarto lugar, a sequência de uma proteína revela muito sobre sua história evolutiva (Capítulo 6). As proteínas se assemelham umas às outras em sua sequência de aminoácidos apenas se têm um ancestral em comum. Consequentemente, eventos moleculares na evolução podem ser rastreados a partir das sequências de aminoácidos; a paleontologia molecular é uma próspera área de pesquisa.

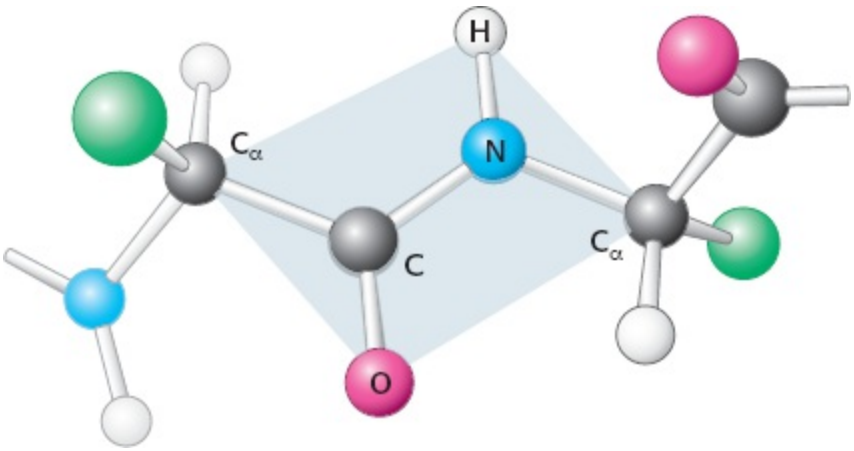
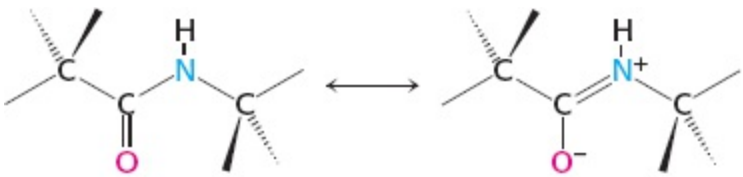


Figura 2.18 Ligações peptídicas são planas. Em um par de aminoácidos ligados, seis átomos (C_α, C, O, N, H e C_α) estão em um mesmo plano. As cadeias laterais são mostradas como esferas verdes.

As cadeias polipeptídicas são flexíveis, mas têm restrições conformacionais

A observação da geometria do arcabouço proteico revela diversas propriedades importantes. Em primeiro lugar, *a ligação peptídica é essencialmente plana* (Figura 2.18). Desta maneira, em um par de aminoácidos unidos por uma ligação peptídica, seis átomos alinham-se no mesmo plano: o carbono α e o grupo CO do primeiro aminoácido e o grupo NH e o carbono α do segundo aminoácido. Em um peptídio, a natureza química desta ligação é responsável pela conformação plana da ligação, que alterna entre uma ligação simples e dupla. Em função deste *caráter de dupla ligação*, a rotação em torno desta ligação é evitada e, assim, a conformação do arcabouço do peptídio é restrita.



Estruturas de ressonância da ligação peptídica

O caráter de dupla ligação também é exibido por meio do comprimento da ponte entre os grupos CO e NH. A distância C—N em uma ligação peptídica é tipicamente de 1,32 Å, valor intermediário entre os esperados para uma ligação C–N simples (1,49 Å) e uma ligação C=N dupla (1,27 Å), como mostrado na Figura 2.19. Finalmente, a ligação peptídica não tem carga, permitindo que polímeros de aminoácidos unidos por ligações peptídicas formem estruturas globulares densamente compactadas.

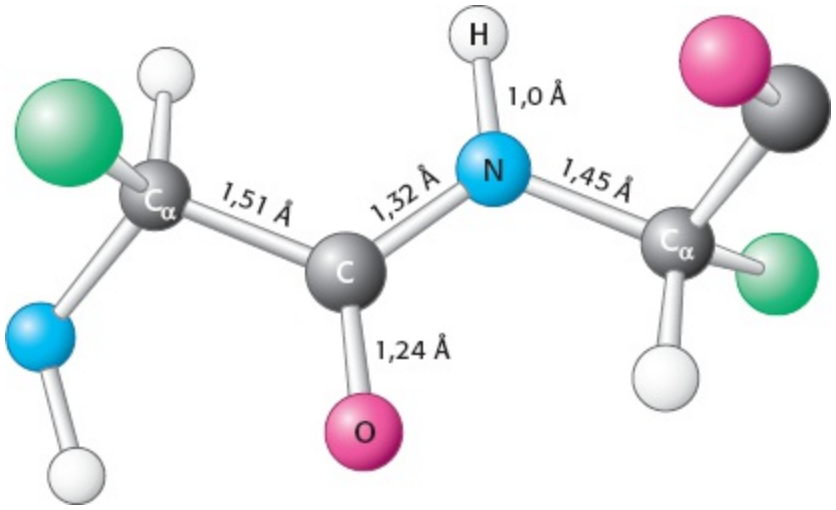


Figura 2.19 Comprimentos usuais de ligações em um peptídio. O peptídio é mostrado com a configuração trans.

Duas configurações são possíveis para uma ligação peptídica plana. Na configuração *trans*, os dois átomos de carbono α estão em lados opostos da ligação peptídica. Na configuração *cis*, estes grupos estão do mesmo lado da ligação peptídica. *Praticamente todas as ligações peptídicas das proteínas são trans*. Esta preferência para a configuração trans em detrimento da cis pode ser explicada porque colisões estéricas entre os grupos unidos ao carbono α impedem a formação da configuração cis, mas não ocorrem na trans (Figura 2.20). Claramente, as ligações peptídicas cis mais comuns são as X—Pro. Estas ligações têm menos preferência pela configuração trans porque o nitrogênio da prolina é ligado a dois átomos de carbono tetraédricos, limitando as diferenças estéricas entre as formas cis e trans (Figura 2.21).

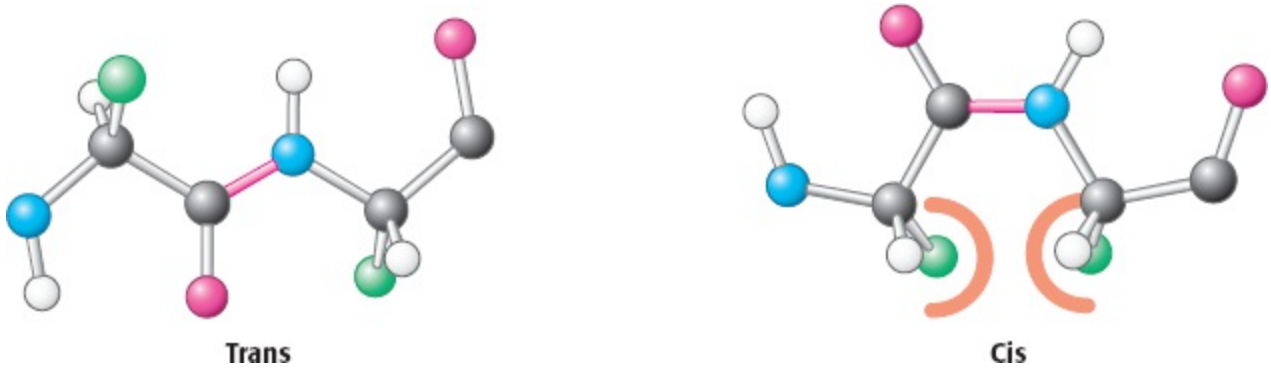


Figura 2.20 Ligações peptídicas trans e cis. A forma trans é favorecida em virtude das colisões estéricas que ocorrem na forma cis.

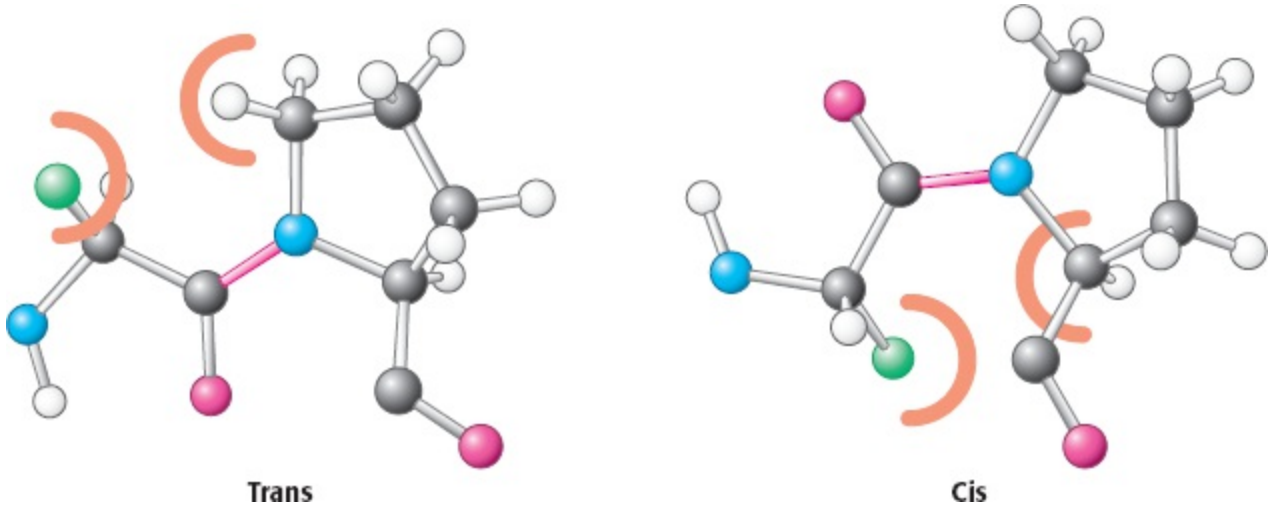


Figura 2.21 Ligações trans e cis X–Pro. As energias destas formas são semelhantes uma à outra porque as colisões estéricas ocorrem em ambas.

Ao contrário do que ocorre com as ligações peptídicas, as ligações entre o grupo amino e o carbono α e entre o carbono α e grupo carbonila são ligações puramente simples. Os dois peptídios rígidos adjacentes podem rodar em torno destas ligações, adquirindo várias orientações. *Esta liberdade de rotação entre duas ligações de cada aminoácido permite que as proteínas possam se enovelar de muitas formas diferentes.* As rotações sobre estas ligações podem ser especificadas por *ângulos de torção* (Figura 2.22). O ângulo de rotação sobre a ligação entre o nitrogênio e o carbono α é chamado de phi (ϕ). O ângulo de rotação sobre a ligação entre o carbono α e o átomo de carbono do carbonil é chamado de psi (ψ). Uma rotação no sentido horário sobre ambas as ligações, como a observada quando o átomo de nitrogênio desloca-se na direção do carbono α ou quando o grupo carbonil desloca-se em direção ao carbono α, corresponde a um valor positivo. Os ângulos de ϕ e ψ determinam o trajeto da cadeia polipeptídica.

Ângulo de torção
A medida da rotação sobre uma ligação, normalmente entre −180 e + 180°. Os ângulos de torção são às vezes chamados de ângulos diedros.

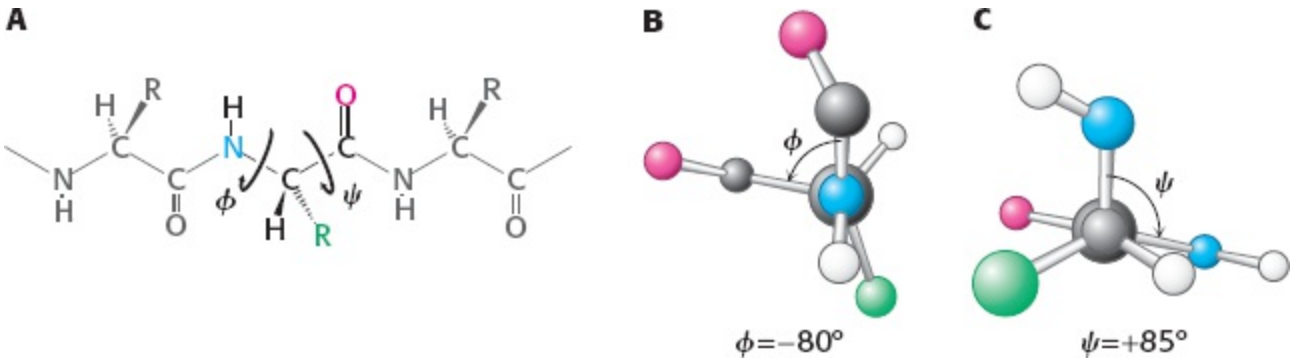


Figura 2.22 Rotação em torno das ligações em um polipeptídio. A estrutura de cada aminoácido em uma cadeia polipeptídica pode ser ajustada por meio da rotação de duas ligações simples. **A.** Phi (ϕ) é o ângulo de rotação sobre a ligação entre o nitrogênio e o carbono α, enquanto psi (ψ) é o ângulo de rotação sobre a ligação entre o carbono α e o carbono do grupo carbonil. **B.** Uma vista da ligação entre os átomos de nitrogênio e o carbono α, mostrando como ϕ é medido. **C.** Uma vista da ligação entre os átomos do carbono α e do carbono do grupo carbonil, mostrando como ψ é medido.

Todas as combinações de ϕ e ψ são possíveis? Gopalasamudram Ramachandran reconheceu que muitas combinações não são possíveis em função das colisões estéricas entre os átomos. Os valores permitidos podem ser vistos em um gráfico bidimensional chamado de *diagrama de Ramachandran* (Figura 2.23). Três quartos das combinações possíveis entre (ϕ, ψ) foram excluídas simplesmente pelas colisões estéricas locais. *A exclusão estérica, o fato de que dois átomos não podem estar no mesmo lugar ao mesmo tempo, pode ser um poderoso fundamento de organização das proteínas.*

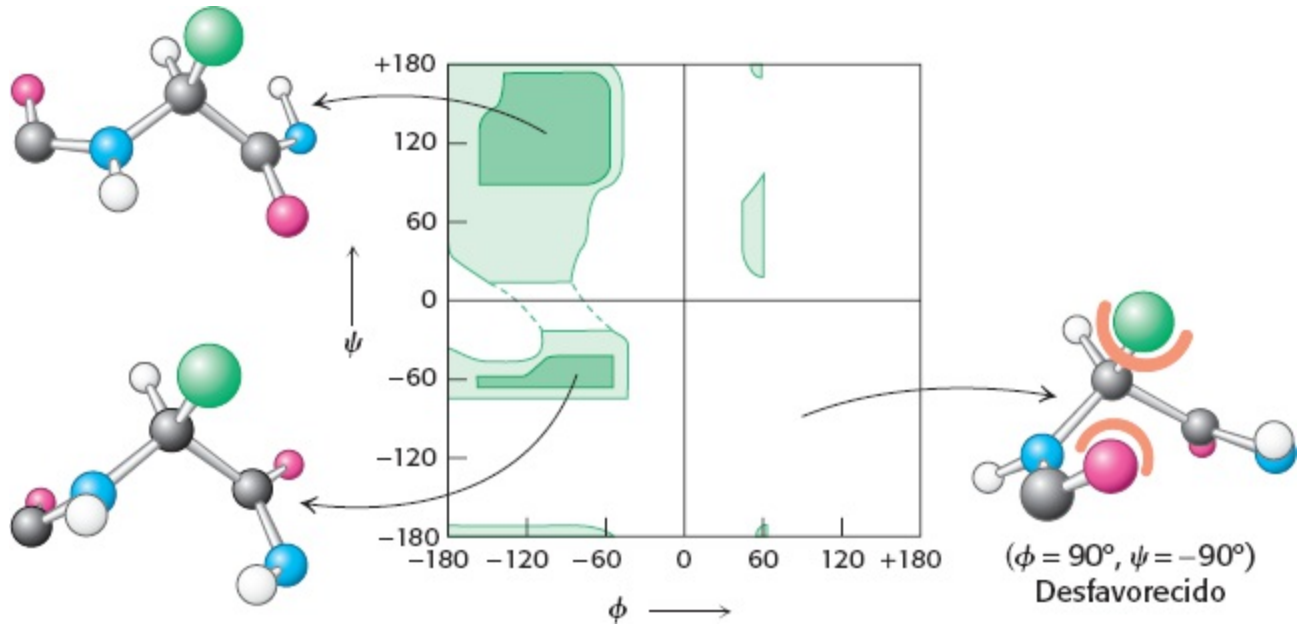


Figura 2.23 Diagrama de Ramachandran mostrando os valores de ϕ e ψ. Nem todos os valores de ϕ e ψ são possíveis sem colisões entre os átomos. As regiões mais favoráveis estão exibidas em verde-escuro; as regiões limítrofes em verde-claro. A estrutura à direita é desfavorecida em razão das colisões estéricas.

A capacidade dos polímeros biológicos como as proteínas de se enovelar em estruturas bem definidas é termodinamicamente notável. Um polímero desnovelado existe como uma mola aleatória: cada cópia de um polímero desnovelado terá conformações diferentes, resultando em uma mistura de muitas conformações possíveis. A entropia favorável à mistura de muitas conformações se opõe ao enovelamento e deve ser superada por interações que favoreçam a forma enovelada. Desta maneira, polímeros altamente flexíveis com um grande número de conformações possíveis não se enovelam em estruturas exclusivas. *A rigidez de um peptídio e o exíguo conjunto de ângulos e permitidos limitam o número de estruturas acessíveis à forma desnovelada o suficiente para permitir que ocorra o enovelamento da proteína.*

2.3 Estrutura secundária | As cadeias polipeptídicas podem se enovelar em estruturas regulares como a alfa-hélice, a folha beta, voltas e alças

Uma cadeia polipeptídica pode se enovelar em uma estrutura com repetições regulares? Em 1951, Linus Pauling e Robert Corey propuseram duas estruturas periódicas chamadas de α-*hélice* (alfa-hélice) e *folha* β *pregueada* (folha beta pregueada). Subsequentemente, outras estruturas como a *volta* β e a laço Ω foram identificadas. Embora não sejam periódicas, estas estruturas em voltas e alças são bem definidas e contribuem com a α-hélice e com a folha β na formação da estrutura final da proteína. As α-hélices, fitas β e voltas são formadas por meio de um padrão regular de pontes de

hidrogênio entre os grupos N—H e C=O dos aminoácidos que estão *próximos uns dos outros na sequência linear* do peptídio. Estes segmentos enovelados são chamados de *estrutura secundária*.

A alfa-hélice é uma estrutura em espiral estabilizada por pontes de hidrogênio internas

Ao avaliar estruturas em potencial, Pauling e Corey consideraram quais conformações dos peptídios seriam estericamente permitidas e quais explorariam melhor a capacidade de formação de pontes de hidrogênio dos grupos NH e CO do arcabouço peptídico. A primeira de suas estruturas propostas, a α-*hélice* é uma estrutura em forma de bastão (Figura 2.24). Um arcabouço espiralado forma a parte interna do bastão e as cadeias laterais se estendem para fora, em forma de hélice. A α-hélice é estabilizada pelas pontes de hidrogênio entre os grupos NH e CO da cadeia principal. Em particular, o grupo CO de cada aminoácido estabelece uma ponte de hidrogênio com o grupo NH do aminoácido que está situado quatro resíduos adiante na sequência (Figura 2.25). Desta maneira, exceto para os aminoácidos que estão próximos às extremidades de uma α-hélice, todos os *grupos CO e NH da cadeia principal estão ligados por pontes de hidrogênio.* Cada resíduo se relaciona com o próximo por uma elevação, também chamada de *translação*, de 15 Å ao longo do eixo da hélice, e uma rotação de 100°, que fornece 3,6 resíduos de aminoácidos por volta da hélice. Assim, os aminoácidos distantes de três a quatro resíduos na sequência estão espacialmente bem próximos um do outro na α-hélice. Ao contrário, os aminoácidos distantes dois resíduos um do outro estão situados em lados opostos da hélice e têm pouca chance de se contatarem. O *passo* da α-hélice é o comprimento de uma volta completa em torno do eixo da hélice e é igual ao produto da elevação (1,5 Å) pelo número de resíduos de cada volta (3,6), ou 5,4 Å. O *sentido do giro* da hélice pode ser de mão direita (sentido horário) ou de esquerda (sentido anti-horário). O diagrama de Ramachandran mostra que ambos sentidos de hélices – de mão direita ou esquerda – estão entre as conformações permitidas (Figura 2.26). No entanto, as hélices com sentido de mão direita são energeticamente mais favoráveis porque há menos colisões estéricas entre as cadeias laterais e o arcabouço. *Essencialmente, todas as* α-*hélices encontradas nas proteínas têm sentido de mão direita.* Nas representações esquemáticas das proteínas, as α-hélices são desenhadas como fitas curvadas ou bastões (Figura 2.27).

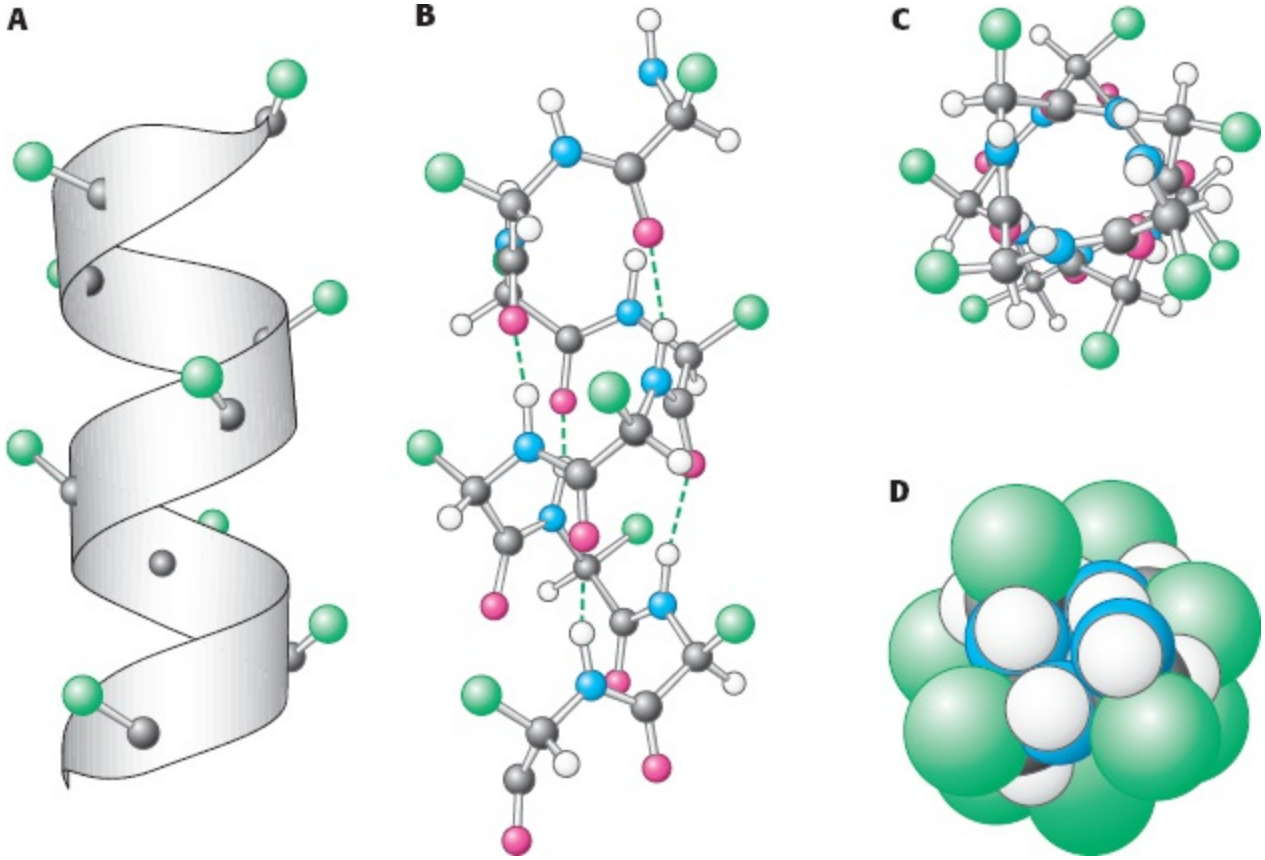


Figura 2.24 Estrutura da α-hélice. **A.** Um esquema na forma de fita mostra os átomos de carbono α e as cadeias laterais (verde). **B.** Uma visão lateral na versão de esferas e bastões mostra as pontes de hidrogênio (linhas tracejadas) entre os grupos NH e CO. **C.** Uma vista do topo mostra o arcabouço espiralado como o interior da hélice e as cadeias laterais (verde) se projetando para fora. **D.** Um modelo de preenchimento espacial da parte C mostra o núcleo interior altamente compactado da hélice.

Sentido do giro

Descreve a direção na qual uma estrutura helicoidal gira em relação ao seu eixo. Se, vista ao longo do eixo da hélice, a cadeia gira em sentido horário, ela tem um sentido do giro de mão direita. Se o giro é anti-horário, o sentido do giro é de mão esquerda.

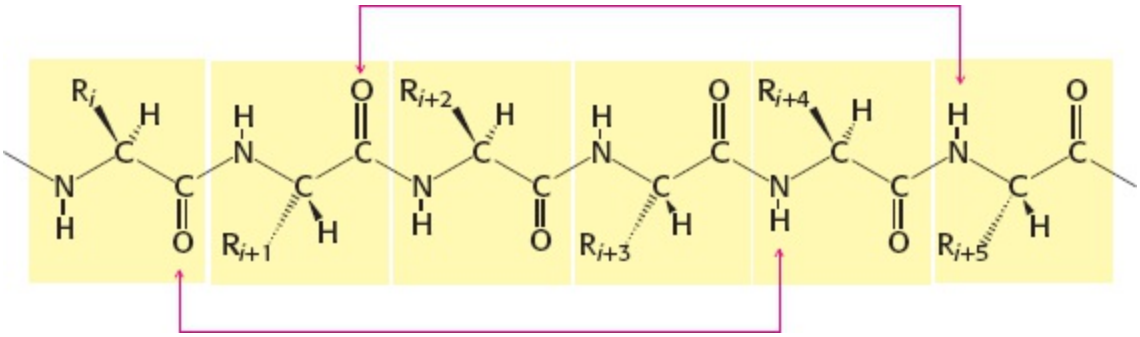


Figura 2.25 Organização das pontes de hidrogênio em uma α-hélice. Na α-hélice, o grupo CO do resíduo *i* forma uma ponte de hidrogênio com o grupo NH do resíduo *i* + 4.

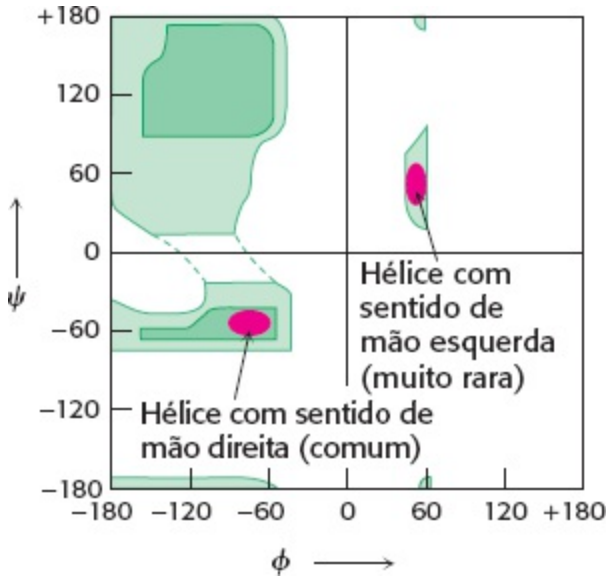


Figura 2.26 Diagrama de Ramachandran para as hélices. Tanto as hélices com sentido de mão direita quanto esquerda estão em regiões de conformações permitidas no diagrama de Ramachandran. No entanto, essencialmente todas as α-hélices das proteínas são com sentido de mão direita.

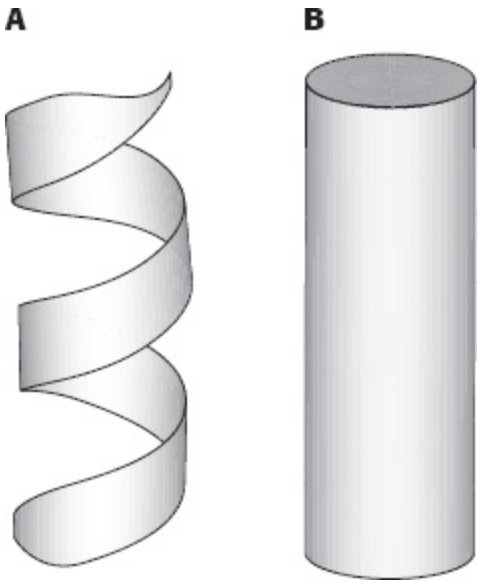


Figura 2.27 Visões esquemáticas das α-hélices. **A.** Uma representação em forma de fita. **B.** Uma representação cilíndrica.

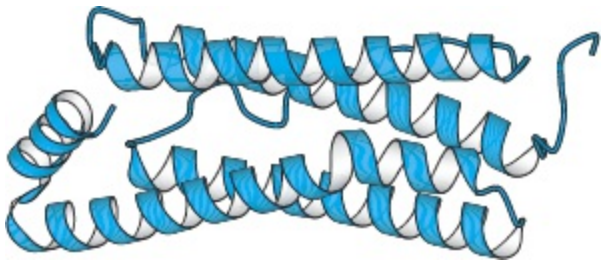


Figura 2.28 Proteína predominantemente constituída por α-hélices. A ferritina, uma proteína que armazena ferro, é constituída por diversas α-hélices. [Desenhada a partir de 1AEW.pdb.]

Nem todos os aminoácidos podem ser prontamente acomodados em uma α-hélice. Ramificações do átomo de carbono β, como na valina, treonina e isoleucina, tendem a desestabilizar as α-hélices em função das colisões estéricas. A serina, o aspartato e a asparagina também tendem a desestabilizar as α-hélices porque suas cadeias laterais têm doadores e aceptores de pontes de hidrogênio próximos à

cadeia principal, onde competem com grupos NH e CO da cadeia principal. A prolina também desestabiliza a α-hélice porque não tem um grupo NH e porque sua estrutura em anel evita que assuma o valor ϕ necessário para a conformação de α-hélice.

O conteúdo de α-hélices nas proteínas varia amplamente, de nenhum a quase 100%. Por exemplo, cerca de 75% dos resíduos da ferritina, uma proteína que auxilia no armazenamento do ferro, estão em α-hélices (Figura 2.28). De fato, cerca de 25% de todas as proteínas solúveis são compostas de α-hélices conectadas por alças e voltas da cadeia polipeptídicas. As α-hélices isoladas têm normalmente menos que 45 Å de comprimento. Muitas proteínas que atravessam as membranas biológicas também contêm α-hélices.

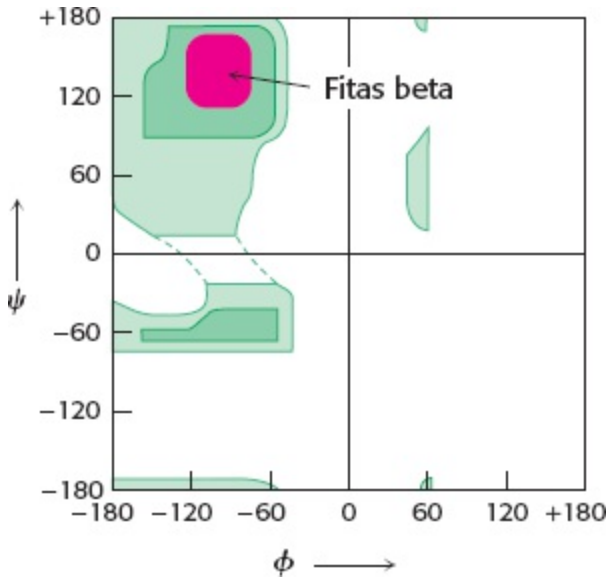


Figura 2.29 Diagrama da Ramachandran para as fitas β. A área vermelha mostra as conformações estéricas permitidas para estruturas estendidas, semelhantes às fitas β.

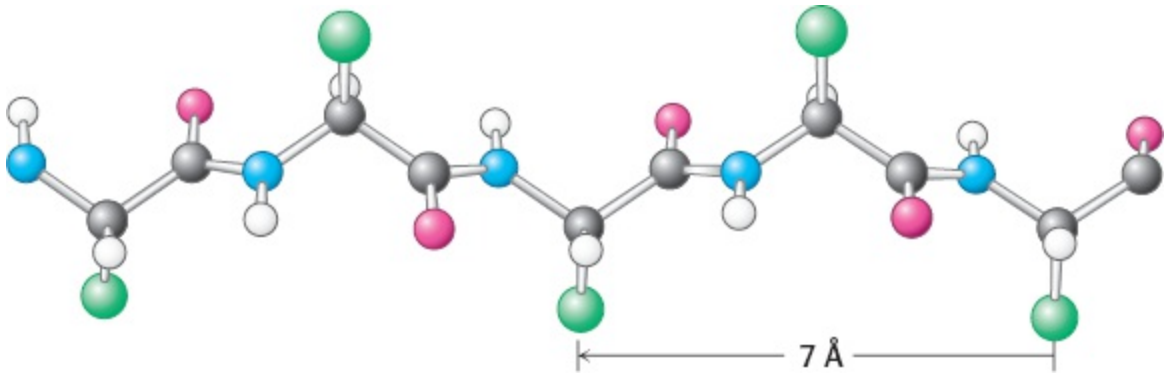


Figura 2.30 Estrutura de uma fita β. As cadeias laterais (verdes) estão alternadamente acima e abaixo do plano da fita.

As folhas beta são estabilizadas por pontes de hidrogênio entre as fitas polipeptídicas

Pauling e Corey propuseram outro padrão periódico estrutural, que chamaram de *folha* β *pregueada* (β porque era a segunda estrutura que eles elucidavam; a α-hélice foi a primeira). A folha β pregueada (ou, mais simplesmente, folha β) é consideravelmente diferente da α-hélice. Ela é composta por duas ou mais cadeias polipeptídicas chamadas de *fitas* β. Uma fita β é praticamente toda estendida, em vez de bem espiralada como na α-hélice. Uma faixa de estruturas estendidas é estericamente possível (Figura 2.29).

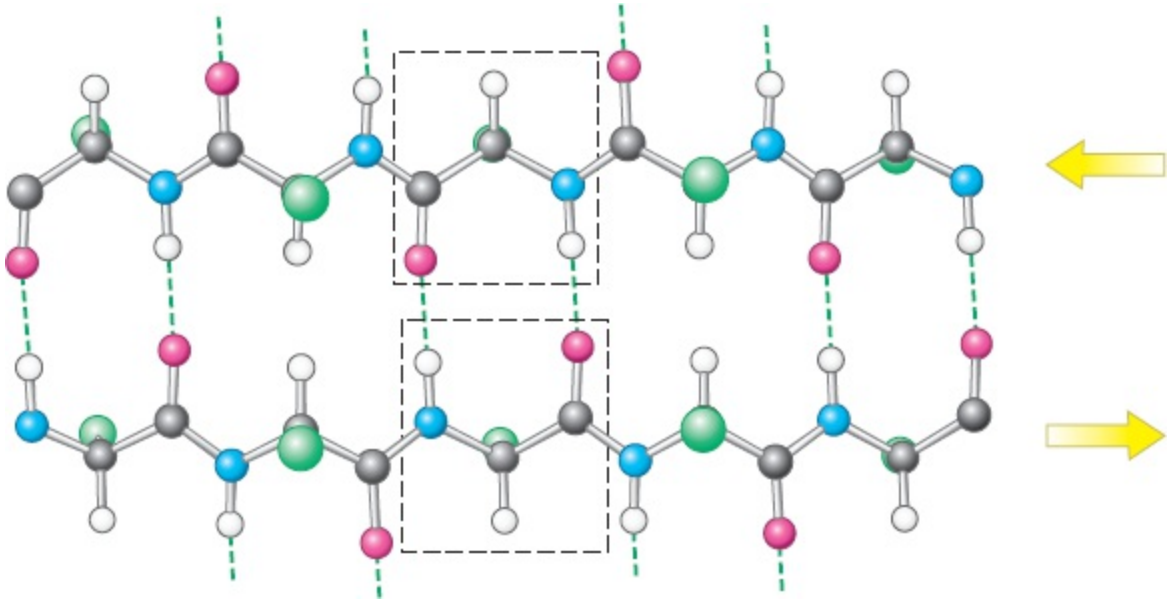


Figura 2.31 Folha β antiparalela. Fitas β adjacentes se dispõem em direções opostas. As pontes de hidrogênio entre os grupos NH e CO conectam cada aminoácido a um único aminoácido da fita adjacente, estabilizando a estrutura.

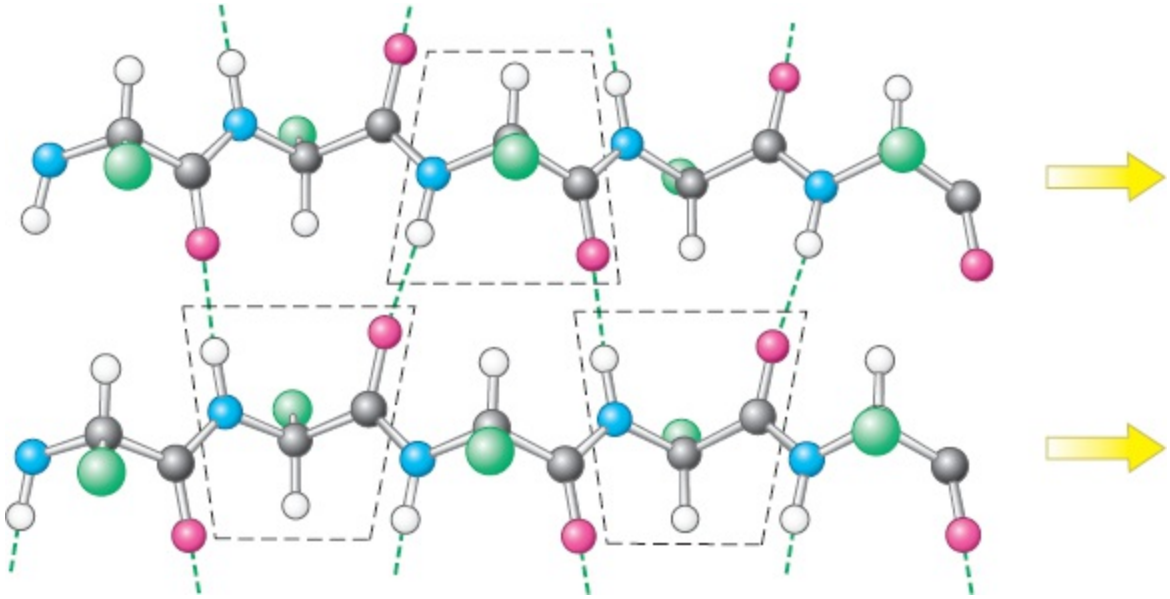


Figura 2.32 Folha β paralela. Fitas β adjacentes se dispõem na mesma direção. As pontes de hidrogênio conectam cada aminoácido de uma fita a dois aminoácidos diferentes na fita adjacente.

A distância entre dois aminoácidos adjacentes ao longo da fita β é de aproximadamente 3,5 Å, em contraste com a distância de 1,5 Å na α-hélice. As cadeias laterais dos aminoácidos adjacentes apontam para direções opostas (Figura 2.30). Uma folha β é formada por meio da ligação de duas ou mais fitas β dispostas próximas uma à outra através de pontes de hidrogênio. As cadeias adjacentes nas folhas β podem se dispor em direções opostas (folha β antiparalela) ou na mesma direção (folha β paralela). Na organização antiparalela, os grupos NH e CO de cada aminoácido estabelecem, respectivamente, pontes de hidrogênio com os grupos CO e NH de um parceiro na cadeia adjacente (Figura 2.31). Na organização paralela, o esquema do estabelecimento das pontes de hidrogênio é um pouco mais complicado. Para cada aminoácido, o grupo NH estabelece pontes de hidrogênio com o grupo CO de um aminoácido da fita adjacente, enquanto o grupo CO estabelece pontes de hidrogênio com o grupo NH do aminoácido que se situa dois resíduos distante ao longo da cadeia (Figura 2.32). Muitas fitas, tipicamente 4 ou 5, ou até mesmo 10 ou mais, podem se unir em folhas β. Tais folhas β

podem ser exclusivamente antiparalelas, exclusivamente paralelas ou mistas (Figura 2.33).

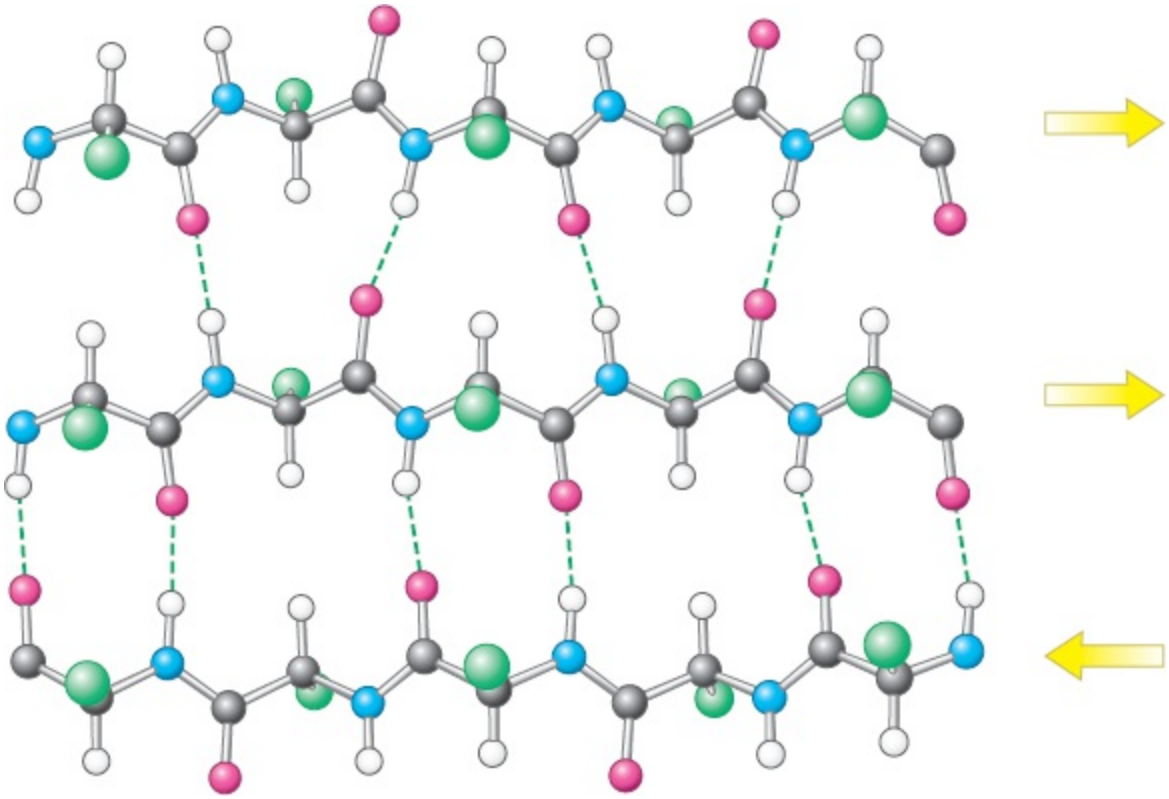


Figura 2.33 Estrutura de uma folha β mista.

Em representações esquemáticas, as fitas β são normalmente desenhadas como setas largas com as cabeças voltadas para a extremidade carboxiterminal, indicando o tipo de folha β formada – paralela ou antiparalela. Mais diversas estruturalmente que as α-hélices, as folhas β podem ser praticamente planas, mas podem ter uma forma retorcida (Figura 2.34). A folha β é um elemento estrutural importante de muitas proteínas. Por exemplo, as proteínas que se ligam aos ácidos graxos, importantes para o metabolismo lipídico, são quase todas compostas por folhas β (Figura 2.35).

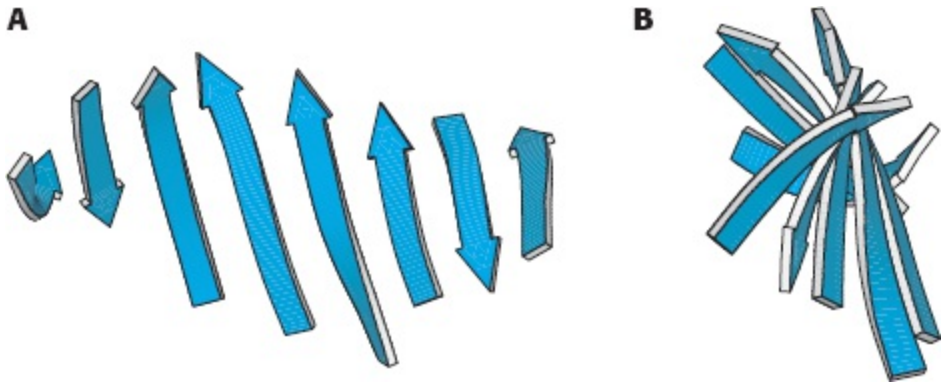


Figura 2.34 Modelo esquemático de uma folha β retorcida. **A.** Um modelo esquemático. **B.** O modelo esquemático rotacionado em 90° para ilustrar a torção mais claramente.

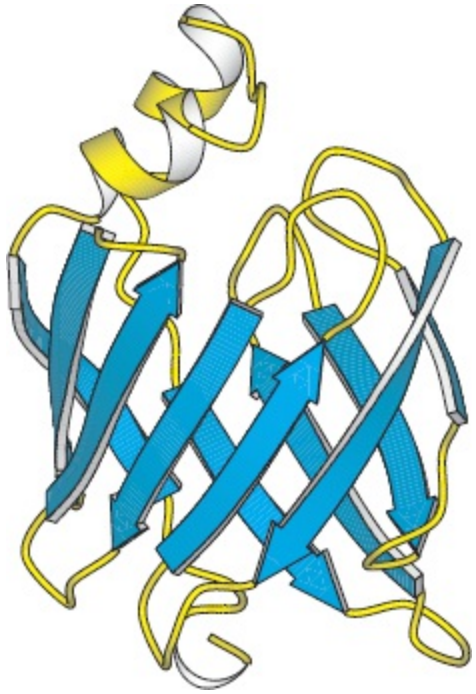


Figura 2.35 Proteína rica em folhas β. A estrutura de uma proteína de ligação de ácido graxo. [Desenhada a partir de 1FTP.pdb.]

As cadeias polipeptídicas podem mudar de direção fazendo voltas reversas e alças

A maioria das proteínas tem formas compactas, globulares, em decorrência de reversões na direção de suas cadeias polipeptídicas. Muitas dessas reversões são devidas a um elemento estrutural comum chamado de *volta reversa* (também conhecido como *volta* β ou *volta em forma de U*, ilustrada na Figura 2.36. Em muitas voltas reversas, o grupo CO do resíduo *i* de um polipeptídio estabelece uma ponte de hidrogênio com o grupo NH do resíduo *i* + 3. Esta interação estabiliza mudanças abruptas na direção da cadeia polipeptídica. Em outros casos, estruturas mais elaboradas são responsáveis pelas reversões da cadeia. Tais estruturas são chamadas de *alças* ou, por vezes, de *alças* Ω (alças ômega), sugerindo sua forma geral. Ao contrário das α-hélices e das fitas β, as alças não têm estruturas regulares e periódicas. No entanto, as estruturas em alças são frequentemente rígidas e bem definidas (Figura 2.37). As voltas e alças invariavelmente se encontram na superfície das proteínas e, portanto, geralmente participam nas interações entre proteínas e outras moléculas.

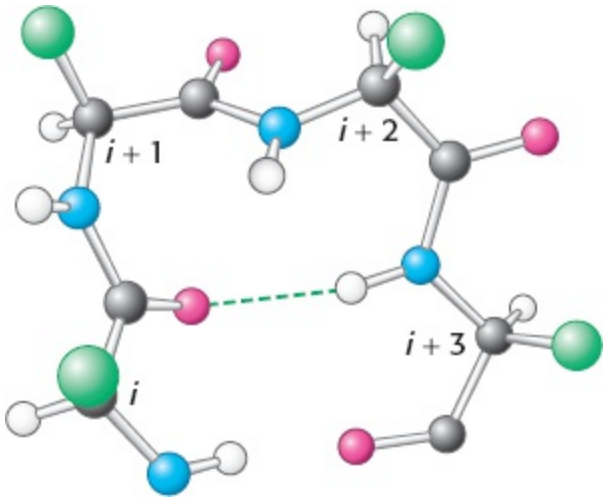


Figura 2.36 Estrutura de uma volta reversa. O grupo CO do resíduo *i* da cadeia polipeptídica estabelece uma ponte de hidrogênio com o grupo NH do resíduo *i* + 3 para estabilizar a volta.

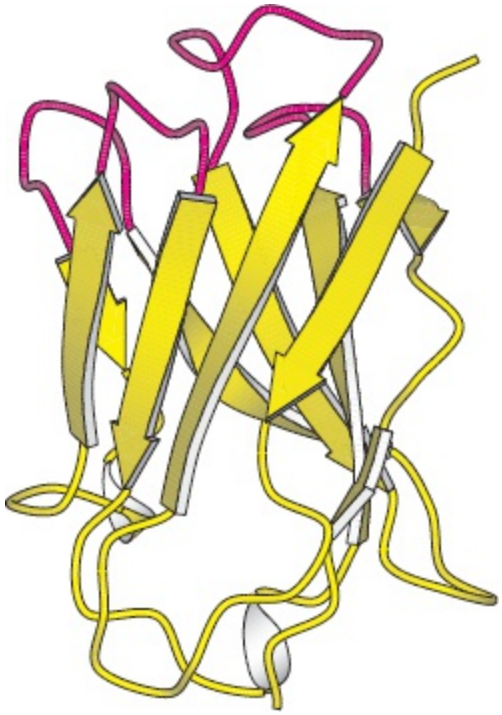


Figura 2.37 Alças na superfície de uma proteína. Uma parte de uma molécula de anticorpo tem alças na superfície (mostrados em vermelho) que medeiam as interações com outras moléculas. [Desenhada a partir de 7FTP.pdb.]

Proteínas fibrosas fornecem suporte estrutural para as células e tecidos

Tipos especiais de hélices estão presentes em duas proteínas: α-queratina e colágeno. Estas proteínas formam fibras longas que têm um papel estrutural.

A α-queratina, que é o componente principal da lã, do cabelo e da pele, consiste em duas α-hélices de mão direita entrelaçadas para formar um tipo de super-hélice de mão esquerda chamada de *super-hélice de hélices* α. A α-queratina é um membro de uma superfamília de proteínas conhecida como *proteínas com super-hélices* (Figura 2.38). Nestas proteínas, duas ou mais α-hélices podem se entrelaçar para formar uma estrutura bem estável, que tem um comprimento de 1.000 Å (100 nm ou 0,1 μm) ou mais. Há aproximadamente 60 membros desta família em humanos, incluindo os filamentos intermediários, proteínas que fazem parte do citoesqueleto (arcabouço interno da célula) e as proteínas musculares miosina e tropomiosina (Seção 35.2). Os membros desta família são caracterizados por uma região central de 300 aminoácidos que contêm repetições imperfeitas de uma sequência de sete aminoácidos chamada de *repetição em héptade*.

As duas hélices na α-queratina têm ligações cruzadas formadas por interações fracas como as forças de van der Waals e interações iônicas. Tais interações são facilitadas pelo fato de que a super-hélice de mão esquerda altera as duas α-hélices de mão direita de modo que haja 3,5 resíduos por volta, em vez de 3,6. Assim, o padrão das interações das cadeias laterais pode ser repetido a cada sete resíduos, formando as repetições em héptades. Duas hélices com tais repetições são capazes de interagir uma com a outra se as repetições forem complementares (Figura 2.39). Por exemplo, os resíduos repetitivos podem ser hidrofóbicos, permitindo interações van der Waals, ou podem ter cargas opostas, permitindo interações iônicas. Além disso, as duas hélices podem se ligar por pontes dissulfeto formadas por resíduos vizinhos de cisteína. A ligação das hélices é a responsável pelas características da lã, um exemplo de α-queratina. A lã é extensível e pode ser esticada a aproximadamente o dobro de seu comprimento porque as α-hélices esticam, quebrando as interações

fracas entre as hélices vizinhas. No entanto, as pontes dissulfeto covalentes resistem à quebra retornando a fibra ao seu estado original assim que as forças de estiramento são retiradas. O número de ligações cruzadas formadas por pontes dissulfeto define, portanto, as propriedades da fibra. O cabelo e a lã, tendo menos ligações cruzadas, são mais flexíveis. Chifres, garras e cascos, que têm mais ligações cruzadas, são mais rígidos.

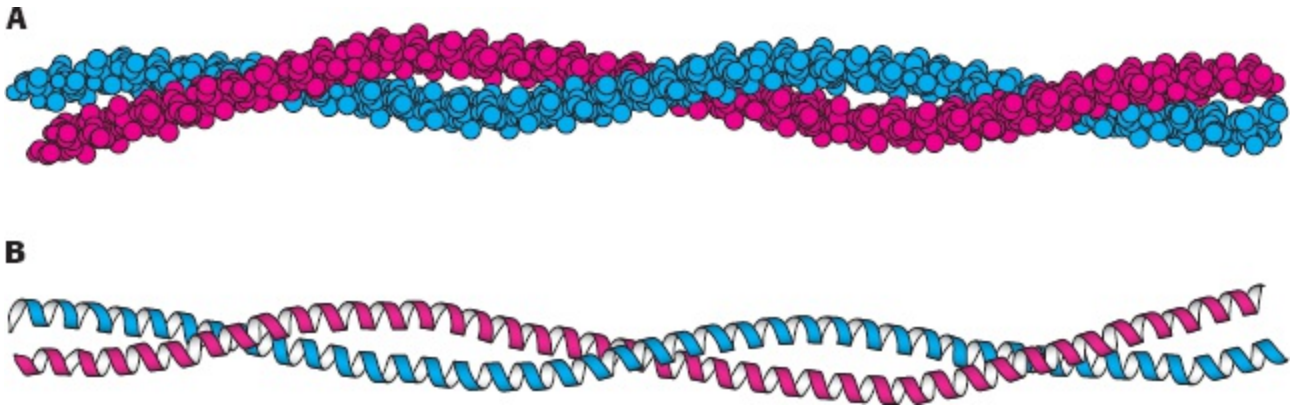


Figura 2.38 Super-hélice de α-hélices. A. Modelo de preenchimento espacial. **B.** Diagrama em fitas. As duas hélices enovelam-se uma em torno da outra para formar uma super-hélice. Estas estruturas são encontradas em muitas proteínas, incluindo a queratina no cabelo, penas, garras e chifres. [Desenhada a partir de 1CIG.pdb.]

Um tipo diferente de hélice está presente no colágeno, a proteína mais abundante dos mamíferos. O colágeno é o principal componente fibroso da pele, ossos, tendões, cartilagem e dentes. Esta proteína extracelular é uma molécula em forma de bastão com aproximadamente 3.000 Å de comprimento e apenas 15 Å de diâmetro. Ela contém três cadeias polipeptídicas helicoidais, cada uma com aproximadamente 1.000 resíduos. A glicina ocorre a cada três resíduos na sequência de aminoácidos e a sequência glicina-prolina-hidroxiprolina é frequentemente recorrente (Figura 2.40). A hidroxiprolina é um derivado da prolina que tem um grupo hidroxila no lugar de um dos átomos de hidrogênio do anel de pirrolidina.

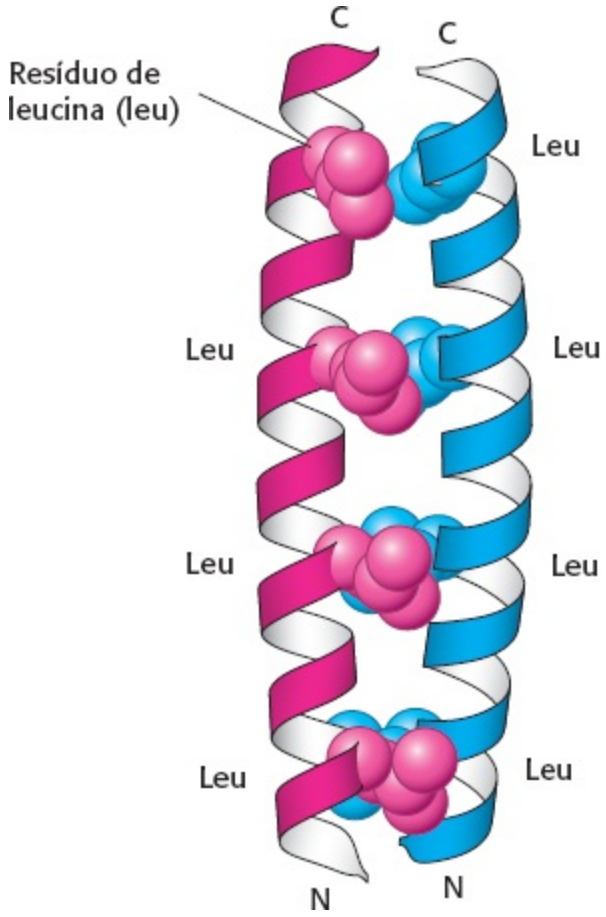


Figura 2.39 Repetições em héptade em uma proteína em super-hélice. A cada sete resíduos de cada hélice há uma leucina. As duas hélices se mantêm juntas por meio de interações van der Waals principalmente entre os resíduos de leucina. [Desenhada a partir de 2ZTA.pdb.]

13
– Gly-Pro-Met-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Arg-
22
– Gly-Leu-Hip-Gly-Pro-Hip-Gly-Ala-Hip-
31
– Gly-Pro-Gln-Gly-Phe-Gln-Gly-Pro-Hip-
40
– Gly-Glu-Hip-Gly-Glu-Hip-Gly-Ala-Ser-
49
– Gly-Pro-Met-Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Hip-
58
– Gly-Pro-Hip-Gly-Lis-Asn-Gly-Asp-Asp-

Figura 2.40 Sequência de aminoácidos de uma parte da cadeia do colágeno. A cada três resíduos há uma glicina. Prolina e hidroxiprolina também são abundantes.

A hélice do colágeno tem proteínas diferentes daquelas da α-hélice. Na fita não há pontes de hidrogênio internas. Em vez disso, *a hélice é estabilizada por repulsão estérica dos anéis de pirrolidina dos resíduos de prolina e de hidroxiprolina* (Figura 2.41). Os anéis de pirrolidina mantêm-se fora do caminho um do outro quando a cadeia polipeptídica adquire sua forma helicoidal, que tem em torno de três resíduos por volta. Três fitas se enovelam em torno de si para formar um cabo em super-hélice que é estabilizado pelas pontes de hidrogênio entre as fitas. As pontes de hidrogênio se formam entre os grupos NH dos resíduos de glicina e os grupos CO dos resíduos de outras cadeias. Os grupos hidroxila dos resíduos de hidroxiprolina também participam na formação

das pontes de hidrogênio, e a ausência de grupos hidroxila acarreta a patologia conhecida como escorbuto (Seção 27.6).

O interior do cabo helicoidal de três fitas é muito denso e responsável pela exigência de que a glicina esteja presente a cada três aminoácidos em cada fita (Figura 2.42A). *O único resíduo que pode caber em uma posição interior é a glicina.* O resíduo de aminoácido em cada lado da glicina é localizado fora do cabo, onde há espaço suficiente para os corpulentos anéis dos resíduos de prolina e hidroxiprolina (Figura 2.42B).

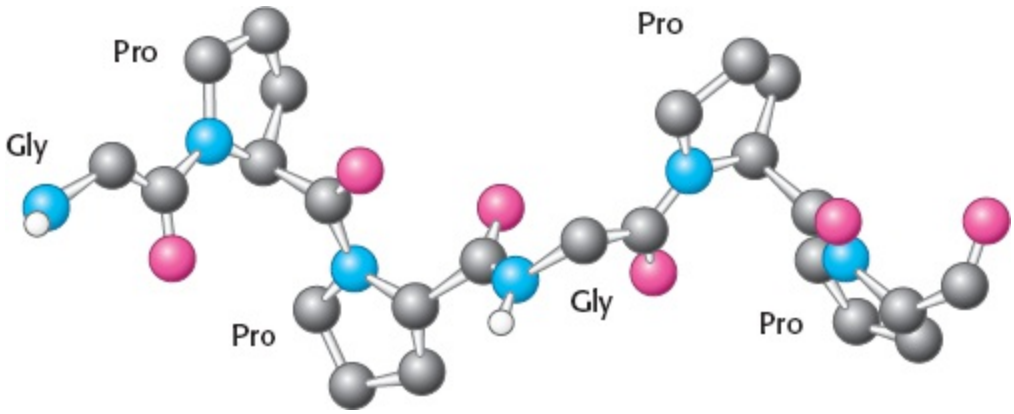


Figura 2.41 Conformação de uma fita única de uma tripla hélice de colágeno.

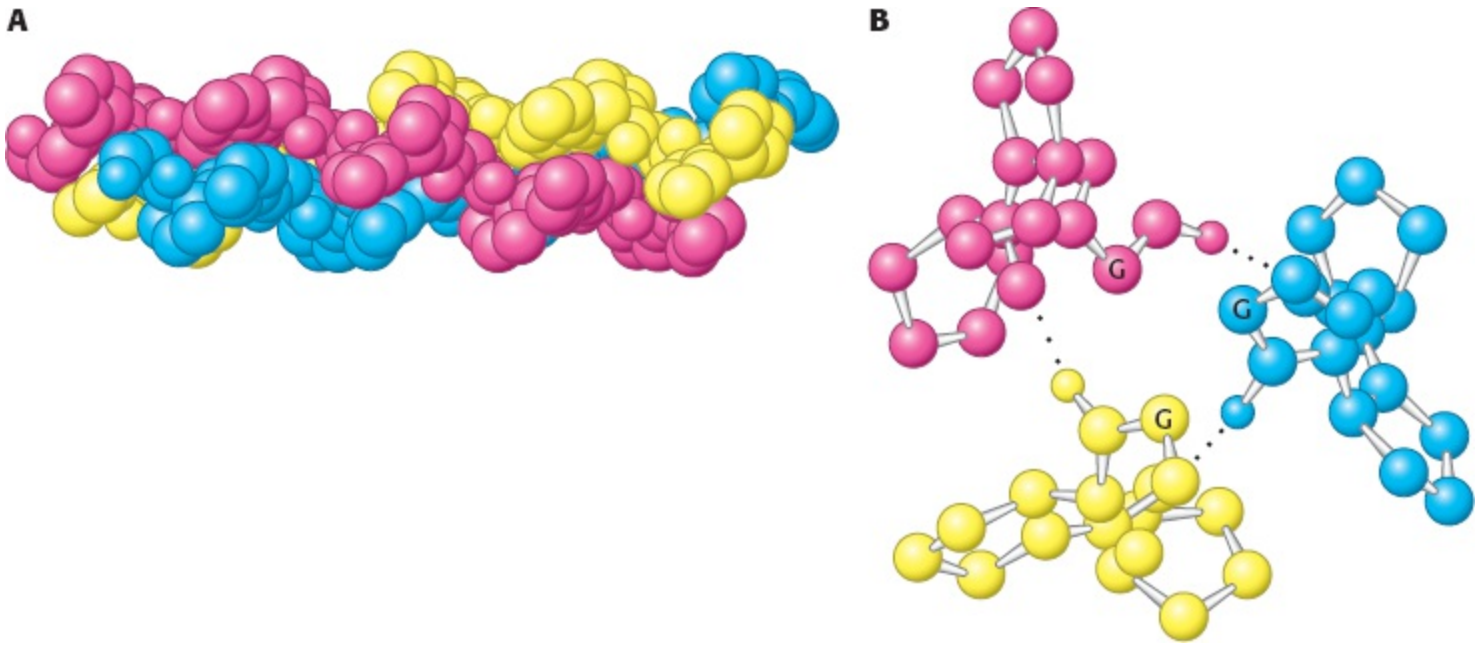


Figura 2.42 Estrutura da proteína colágeno. A. Modelo de preenchimento espacial do colágeno. Cada fita é mostrada com uma cor diferente. **B.** Seção transversal de um modelo de colágeno. Cada fita se liga por meio de pontes de hidrogênio às outras duas. O átomo de carbono α de um resíduo de glicina pode ser identificado pela letra G. Cada terceiro resíduo deve ser uma glicina, porque não há espaço no centro da hélice. *Observe* que os anéis de pirrolidina estão no exterior.

A importância do posicionamento da glicina no interior da tripla hélice é ilustrada pela doença *osteogenesis imperfecta* (osteogênese imperfeita), também conhecida como "doença dos ossos de vidro". Nesta doença, que pode variar de moderada a muito grave, outros aminoácidos substituem o resíduo interno de glicina. Esta substituição leva a um enovelamento tardio e indevido do colágeno, e o acúmulo do colágeno defeituoso leva à morte celular. O sintoma mais grave é a fragilidade óssea. O colágeno defeituoso nos olhos torna a parte branca dos olhos azulada

(“esclerótica azul”).

2.4 Estrutura terciária | As proteínas hidrossolúveis enovelam-se em estruturas compactas com núcleos apolares

Vejamos agora como os aminoácidos são agrupados em uma proteína. A cristalografia de raios X e a ressonância magnética (RM) (Seção 3.6) revelaram as estruturas tridimensionais detalhadas de milhares de proteínas. Começamos aqui com um exame da *mioglobina*, a primeira proteína vista com detalhes no nível atômico.

A mioglobina, transportadora de oxigênio no músculo, é uma cadeia polipeptídica simples de 153 aminoácidos (Capítulo 7). A capacidade da mioglobina de se ligar ao oxigênio depende da presença do *heme*, um *grupo prostético (auxiliar)* não peptídico, constituído por protoporfirina IX e um átomo central de ferro. A *mioglobina é uma molécula extremamente compacta*. Suas dimensões globais são de 45 × 35 × 25 Å, uma ordem de magnitude menor do que se ela fosse completamente distendida (Figura 2.43). Cerca de 70% da cadeia principal é enovelada em oito α-hélices, e muito do restante da cadeia forma voltas e alças entre elas.

O enovelamento da cadeia principal da mioglobina, como a maioria das demais proteínas, é complexo e assimétrico. O trajeto geral de uma cadeia polipeptídica de uma proteína é normalmente conhecido como sua *estrutura terciária*. Um princípio de união emerge a partir da distribuição das cadeias laterais. O fato marcante é que *o interior é constituído praticamente de resíduos apolares* como leucina, valina, metionina e fenilalanina (Figura 2.44). Os resíduos com carga como o aspartato, glutamato, lisina e arginina não estão presentes no interior da mioglobina. Os únicos resíduos polares internos são duas histidinas, que têm função crítica na ligação do ferro e oxigênio. O exterior da mioglobina, por outro lado, é constituído tanto por resíduos polares quanto por apolares. O modelo de preenchimento espacial mostra que há muito pouco espaço vazio no interior.

Esta distribuição contrastante entre os resíduos polares e apolares mostra uma característica-chave na arquitetura proteica: em um meio aquoso, o enovelamento das proteínas é dirigido pela forte tendência dos resíduos hidrofóbicos de serem excluídos da água. Lembre-se de que um sistema é mais termodinamicamente estável quando os elementos hidrofóbicos são agrupados, em vez de disseminados, em meio aquoso (Capítulo 1). *Portanto, a cadeia polipeptídica se enovela de modo que as cadeias laterais se internalizem, enquanto suas cadeias polares carregadas se dispõem na superfície.* Muitas α-hélices e fitas β são anfipáticas; isto é, a α-hélice ou fita β tem um lado hidrofóbico, que se volta para o interior da proteína, e uma face mais polar, que se volta para a solução. O destino da cadeia principal que acompanha as cadeias laterais hidrofóbicas também é importante. Um grupo NH ou CO de um peptídio, não pareado tem muito mais preferência pela água do que por um meio apolar. O segredo da internalização de um segmento da cadeia principal em um ambiente hidrofóbico é parear todos os grupos NH e CO por meio de pontes de hidrogênio. Este pareamento é ordenadamente obtido em uma α-hélice ou folha β. As interações van der Waals entre as cadeias laterais hidrocarbonadas fortemente unidas contribui para a estabilização das proteínas. Podemos agora entender por que o conjunto de 20 aminoácidos contém muitos que diferem discretamente em tamanho e forma: eles fornecem uma gama de elementos de escolha que preenchem perfeitamente o interior da proteína, assim maximizando as interações de van der Waals, que

demandam contato íntimo.

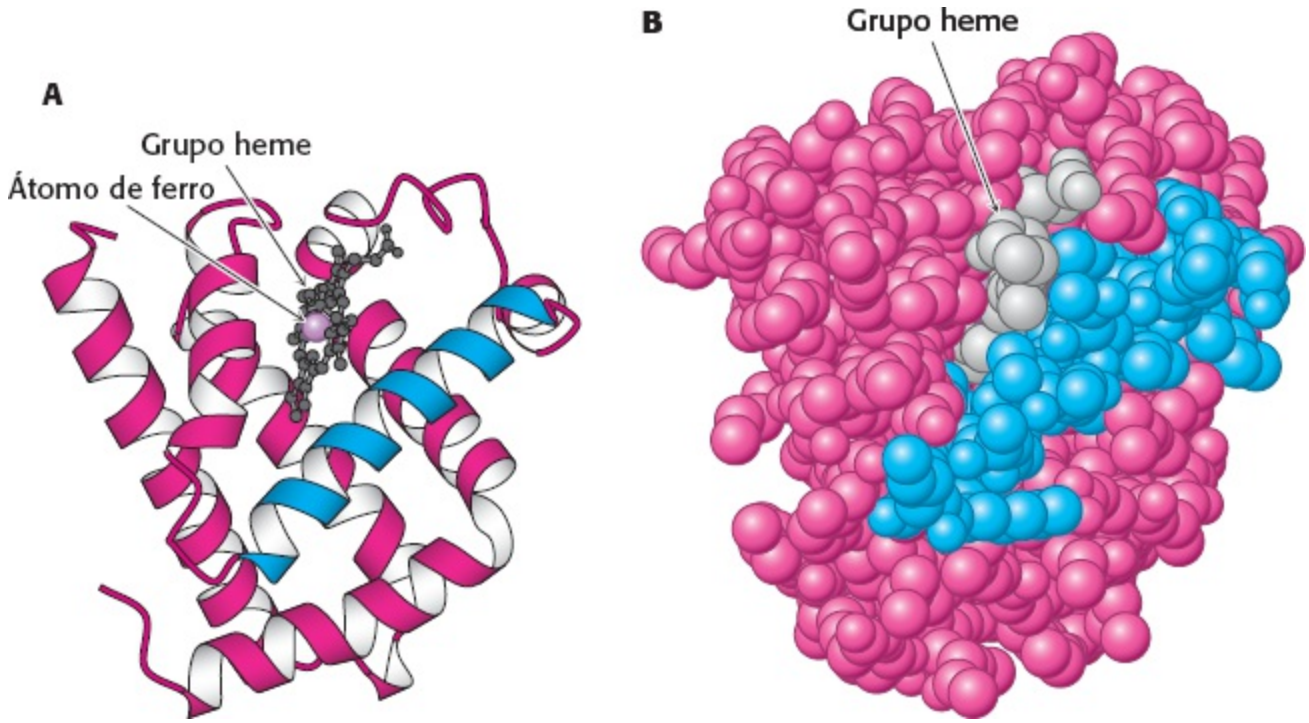


Figura 2.43 Estrutura tridimensional da mioglobina. **A.** Um diagrama em fita mostra que a proteína é constituída majoritariamente por α-hélices. **B.** Um modelo de preenchimento espacial na mesma orientação mostra como a proteína enovelada é altamente acondicionada. *Observe* que o grupo heme está aninhado em uma fenda da proteína compacta, com apenas uma borda exposta. Uma hélice é azul, para permitir a comparação das duas ilustrações estruturais. [Desenhada a partir de 1A6N.pdb.]

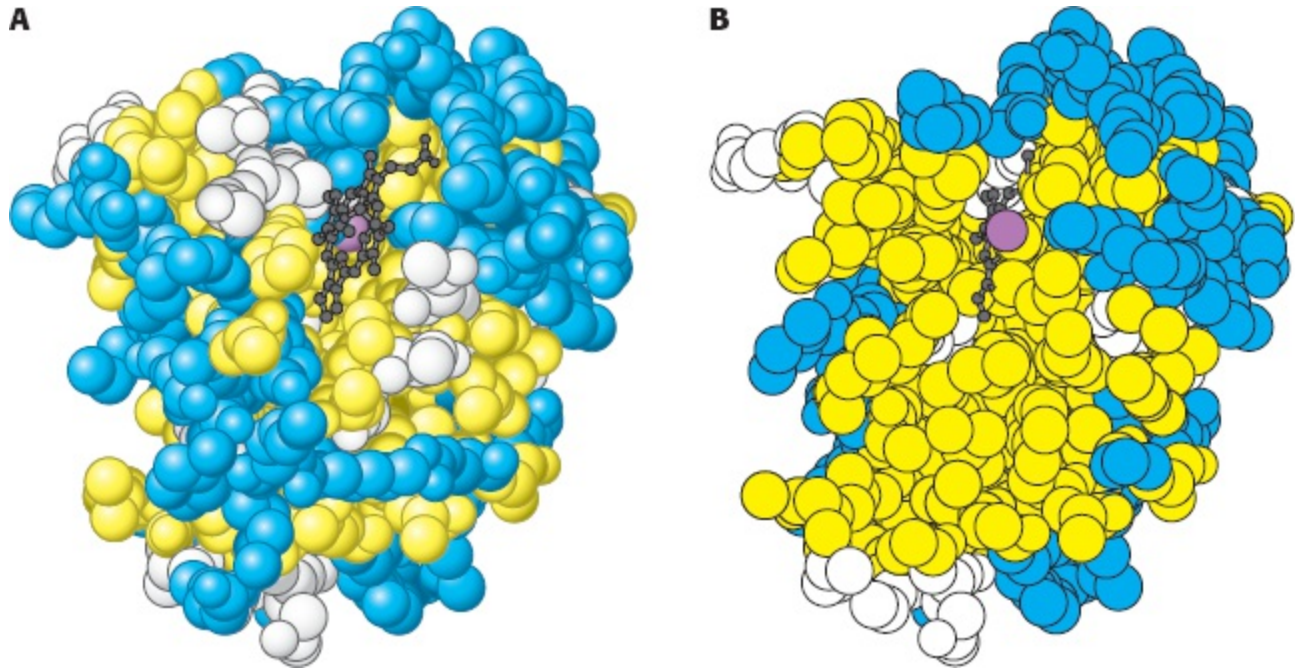


Figura 2.44 Distribuição dos aminoácidos na mioglobina. A. Um modelo de preenchimento espacial da mioglobina com os aminoácidos hidrofóbicos mostrados em amarelo, os aminoácidos carregados mostrados em azul e os demais em branco. Observe que a superfície da molécula tem muitos aminoácidos carregados, assim como alguns aminoácidos hidrofóbicos. **B.** Nesta seção transversa, note que a maioria dos aminoácidos hidrofóbicos encontra-se no interior da estrutura, enquanto os aminoácidos carregados estão na superfície da proteína. [Desenhada a partir de 1MBD.pdb.]

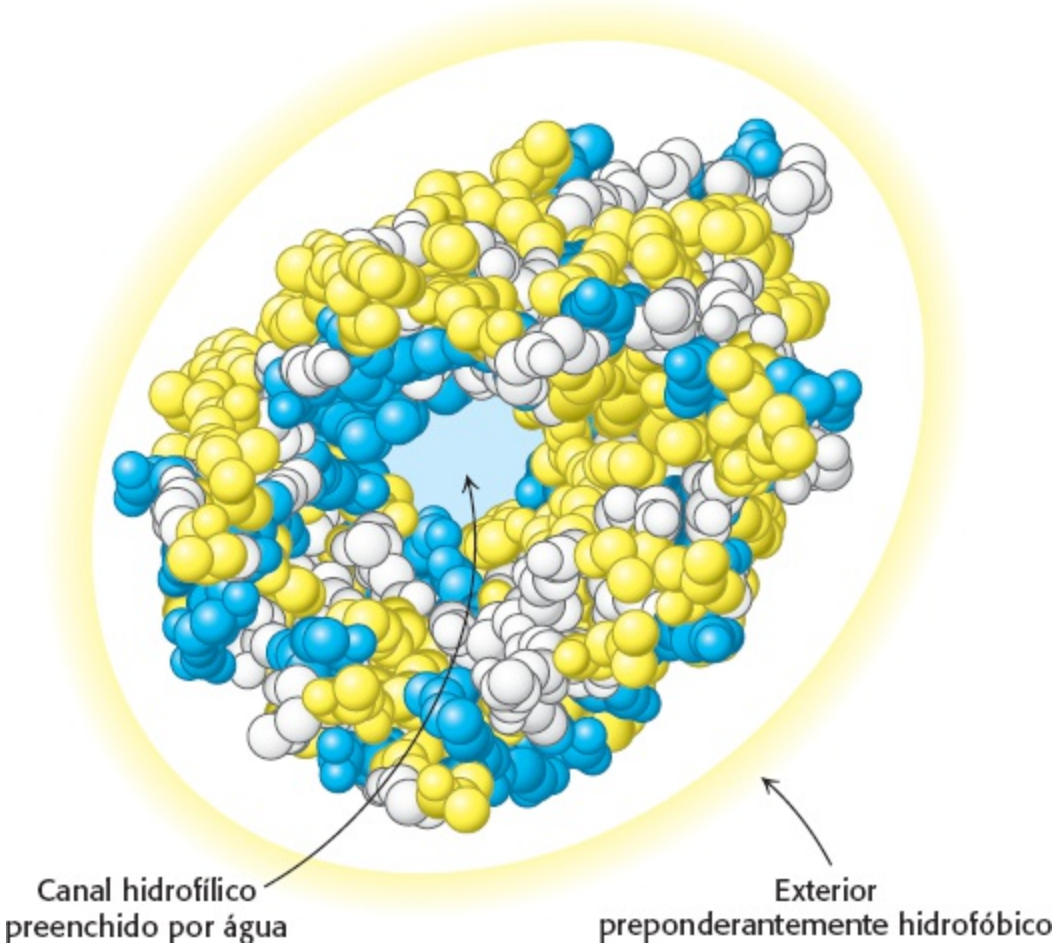


Figura 2.45 Distribuição de aminoácidos "de dentro para fora" na porina. O exterior da porina (que faz contato com grupos hidrofóbicos nas membranas) é majoritariamente coberto por resíduos hidrofóbicos, enquanto o centro inclui um canal preenchido por água revestido por aminoácidos polares e carregados. [Desenhada a partir de 1PRN.pdb.]

Algumas proteínas que atravessam as membranas biológicas são "as exceções que confirmam a regra", porque têm a distribuição contrária dos aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos. Por exemplo, considere as porinas, proteínas encontradas nos membranas externas de muitas bactérias (Figura 2.45). As membranas são construídas principalmente por cadeias hidrofóbicas de alcanos (Seção 12.2). Desta maneira, as porinas estão cobertas principalmente por resíduos hidrofóbicos que interagem com as cadeias vizinhas dos alcanos. Ao contrário, o centro da proteína contém muitos aminoácidos polares e carregados, que cercam um canal preenchido por água que atravessa o centro da proteína. Assim, como as porinas funcionam em meios hidrofóbicos, elas são "de dentro para fora", quando comparadas às proteínas que funcionam em meio aquoso.

Certas combinações de estrutura secundária estão presentes em muitas proteínas e frequentemente exibem funções semelhantes. Estas combinações são chamadas de *motivos* ou *estruturas supersecundárias*. Por exemplo, uma α-hélice separada de outra α-hélice por uma volta, chamada de unidade de *hélice-volta-hélice*, é encontrada em muitas proteínas que se ligam ao DNA (Figura 2.46).

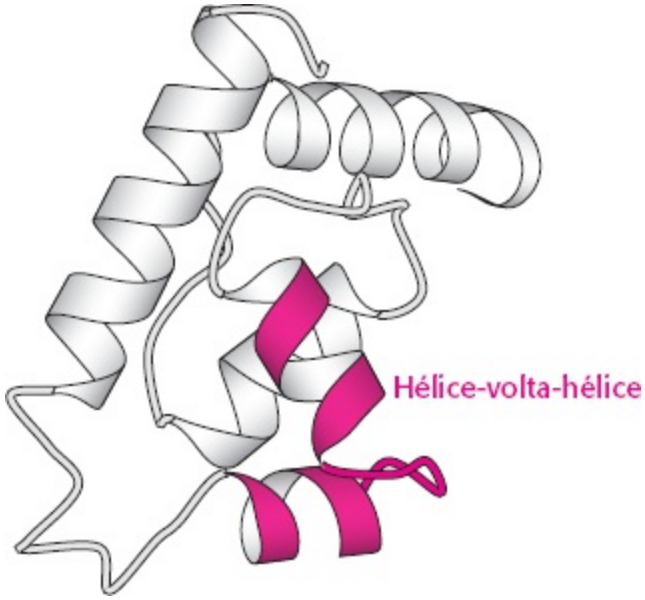


Figura 2.46 O motivo hélice-volta-hélice, um elemento estrutural supersecundário. Motivos hélice-volta-hélice são encontrados em muitas proteínas ligantes de DNA. [Desenhada a partir de 1LMB.pdb.]

Algumas cadeias polipeptídicas enovelam-se em duas ou mais regiões compactas que podem se conectar por um segmento flexível da cadeia polipeptídica, como pérolas em um cordão. Estas unidades globulares compactas, chamadas de *domínios*, variam em tamanho, de cerca de 30 a 400 resíduos de aminoácidos. Por exemplo, a parte extracelular da CD4, a proteína de superfície celular de algumas células do sistema imune às quais o vírus da imunodeficiência humana (HIV) se liga, contém quatro domínios semelhantes de aproximadamente 100 aminoácidos cada (Figura 2.47). As proteínas podem ter domínios em comum mesmo quando suas estruturas terciárias gerais são diferentes.

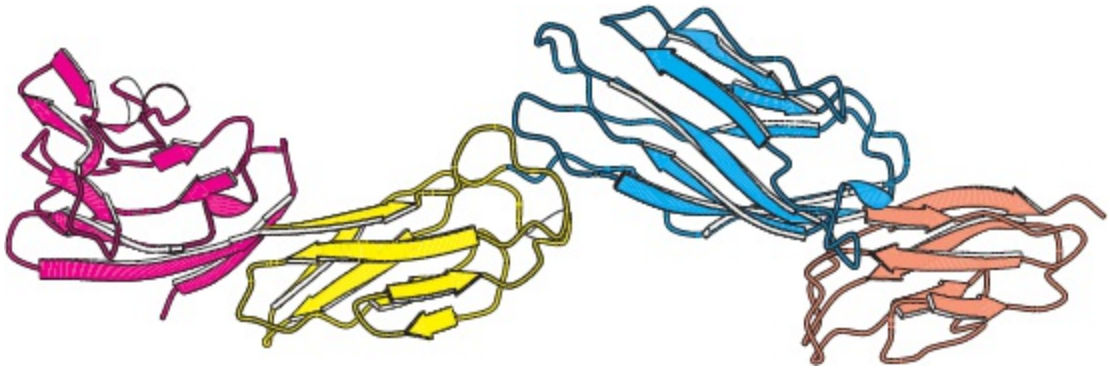


Figura 2.47 Domínios de proteínas. A proteína de superfície celular CD4 consiste em quatro domínios similares. [Desenhada a partir de 1WIO.pdb.]

2.5 Estrutura quaternária | As cadeias polipeptídicas podem se unir formando estruturas com múltiplas subunidades

Quatro níveis de estrutura são frequentemente citados em discussões sobre a arquitetura das proteínas. Até agora, abordamos três deles. A *estrutura primária* é a sequência de aminoácidos. A *estrutura secundária* refere-se à organização espacial dos resíduos de aminoácidos vizinhos na sequência. Algumas destas organizações são regulares, dando origem a uma estrutura periódica. A α-

hélice e a fita β são elementos da estrutura secundária. A *estrutura terciária* refere-se à organização especial dos resíduos de aminoácidos que estão distantes uns dos outros na sequência e ao padrão das pontes dissulfeto. Agora nos voltamos para as proteínas que contêm mais de uma cadeia polipeptídica. Essas proteínas exibem um quarto nível de organização estrutural. Cada cadeia polipeptídica neste tipo de proteína é chamada de *subunidade*. A *estrutura quaternária* refere-se à organização espacial das subunidades e à natureza de suas interações. O tipo mais simples de estrutura quaternária é um *dímero*, constituído por duas subunidades idênticas. Esta organização está presente na proteína ligante de DNA Cro, encontrada em um bacteriófago chamado de λ (Figura 2.48). Estruturas quaternárias mais complexas são comuns também. Mais de um tipo de subunidade pode estar presente, geralmente em quantidade variável. Por exemplo, a hemoglobina humana, a proteína carreadora de oxigênio no sangue, é constituída por duas subunidades de um tipo (designada α) e duas subunidades de outro tipo (designada β), como ilustrado na Figura 2.49. Assim, a molécula de hemoglobina existe como um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$. Mudanças sutis na organização interna das subunidades da hemoglobina permitem que ela transporte oxigênio dos pulmões aos tecidos com grande eficiência (Capítulo 7).

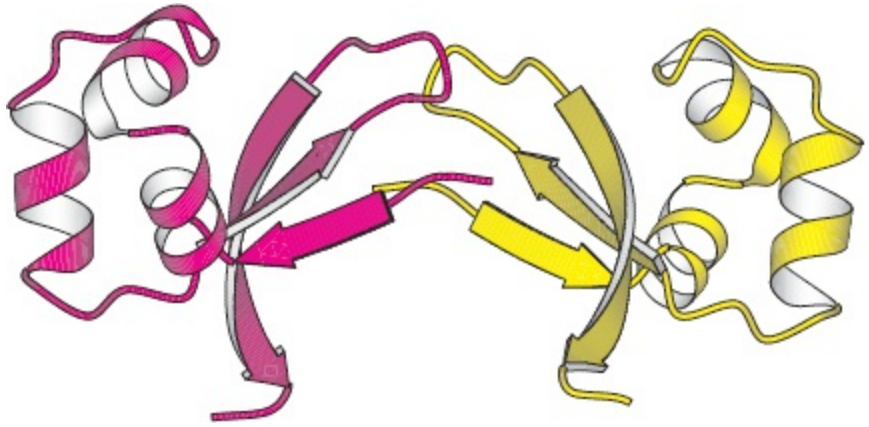


Figura 2.48 Estrutura quaternária. A proteína Cro do bacteriófago λ é um dímero com subunidades idênticas. [Desenhada a partir de 5CRO.pdb.]

Os vírus usam ao máximo uma limitada quantidade de material genético formando revestimentos que utilizam o mesmo tipo de subunidade proteica, em uma organização repetitiva e simétrica. O revestimento do rinovírus, o vírus que causa o resfriado comum, inclui 60 cópias de cada uma de quatro subunidades (Figura 2.50). As subunidades se unem para formar uma cápsula quase esférica que envolve o genoma viral.

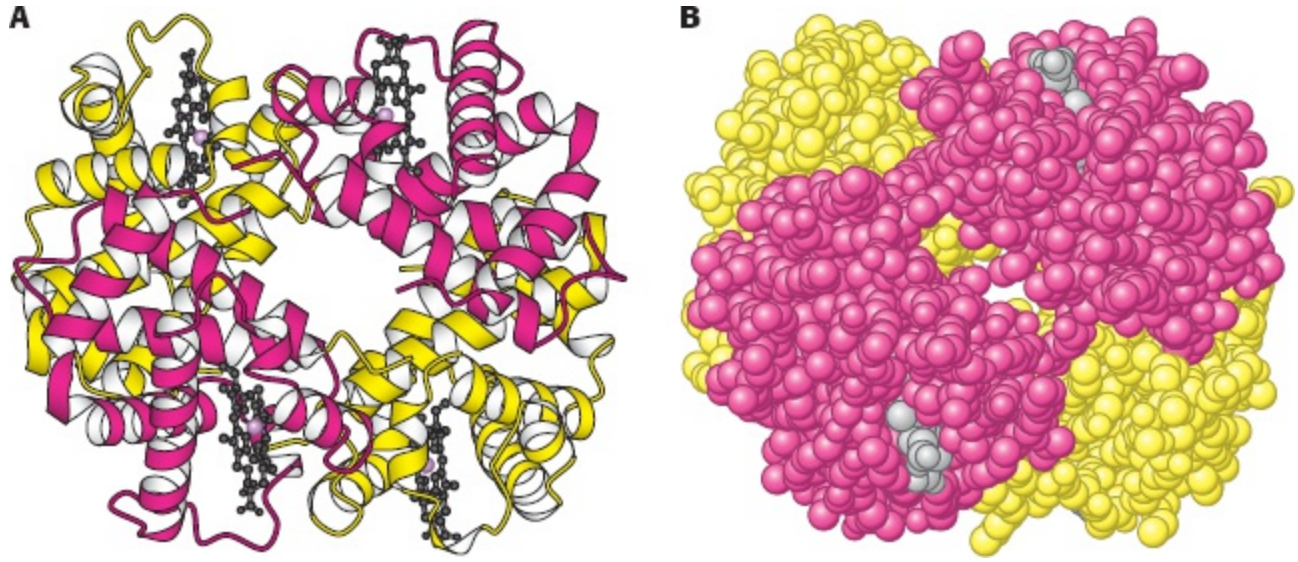


Figura 2.49 Tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ da hemoglobina humana. A estrutura das duas subunidades idênticas (vermelho) é semelhante, mas não idêntica, à estrutura das duas subunidades idênticas β (amarelo). A molécula contém quatro grupos heme (cinza, com o átomo de ferro mostrado em roxo). **A.** O diagrama de fitas destaca a semelhança entre as subunidades e mostra que elas são compostas principalmente de α-hélices. **B.** O modelo de preenchimento espacial ilustra como os grupos heme ocupam as fendas na proteína. [Desenhada a partir de 1A3N.pdb.]

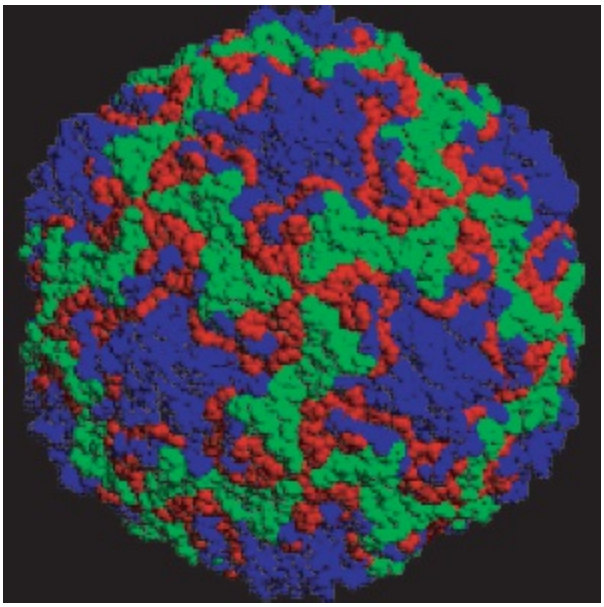


Figura 2.50 Estrutura quaternária complexa. O revestimento do rinovírus humano, a causa do resfriado comum, é constituído por 60 cópias de cada uma das quatro subunidades. As três subunidades mais salientes são vistas em diferentes cores.

2.6 A sequência de aminoácidos de uma proteína determina sua estrutura tridimensional

Como é obtida a elaborada estrutura tridimensional das proteínas? O trabalho clássico de Christian Anfinsen nos anos de 1950 sobre a enzima ribonuclease revelou a relação entre a sequência de aminoácidos de uma proteína e sua conformação. A ribonuclease é uma cadeia polipeptídica única constituída por 124 resíduos de aminoácidos entrecruzados por quatro pontes dissulfeto (Figura 2.51). A ideia de Anfinsen era destruir a estrutura tridimensional da enzima e então determinar quais as condições necessárias para restaurar a estrutura.

Compostos como a ureia ou cloreto de guanidínio são eficazes em quebrar as ligações não covalentes das proteínas. Embora o mecanismo de ação destes compostos não seja completamente compreendido, simulações em computador sugerem que eles substituem água como na solvatação da proteína e então são capazes de romper as interações van der Waals que estabilizam a estrutura proteica. As pontes dissulfeto podem ser quebradas de maneira reversível por meio de sua redução com um composto como β-*mercaptoetanol* (Figura 2.52). Na presença de grandes quantidades de β-mercaptoetanol, os dissulfetos (cistinas) são completamente convertidos a sulfidrilas (cisteínas).

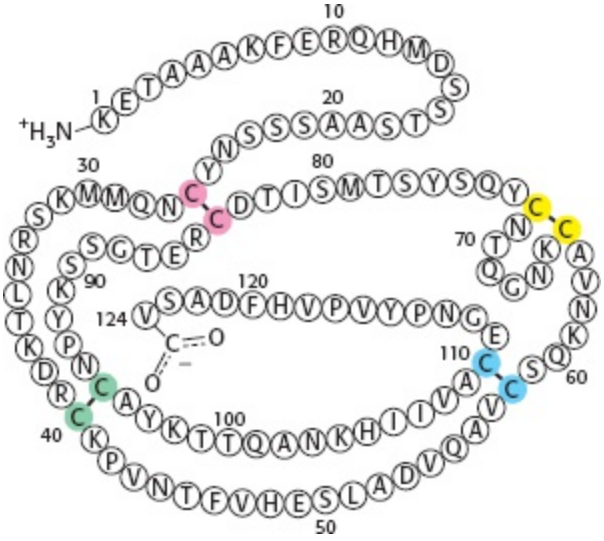


Figura 2.51 Sequência de aminoácidos da ribonuclease bovina. As quatro pontes dissulfeto estão destacas em cores. [Segundo C. H. W. Hirs, S. Moore e W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 235:633-647, 1960.]

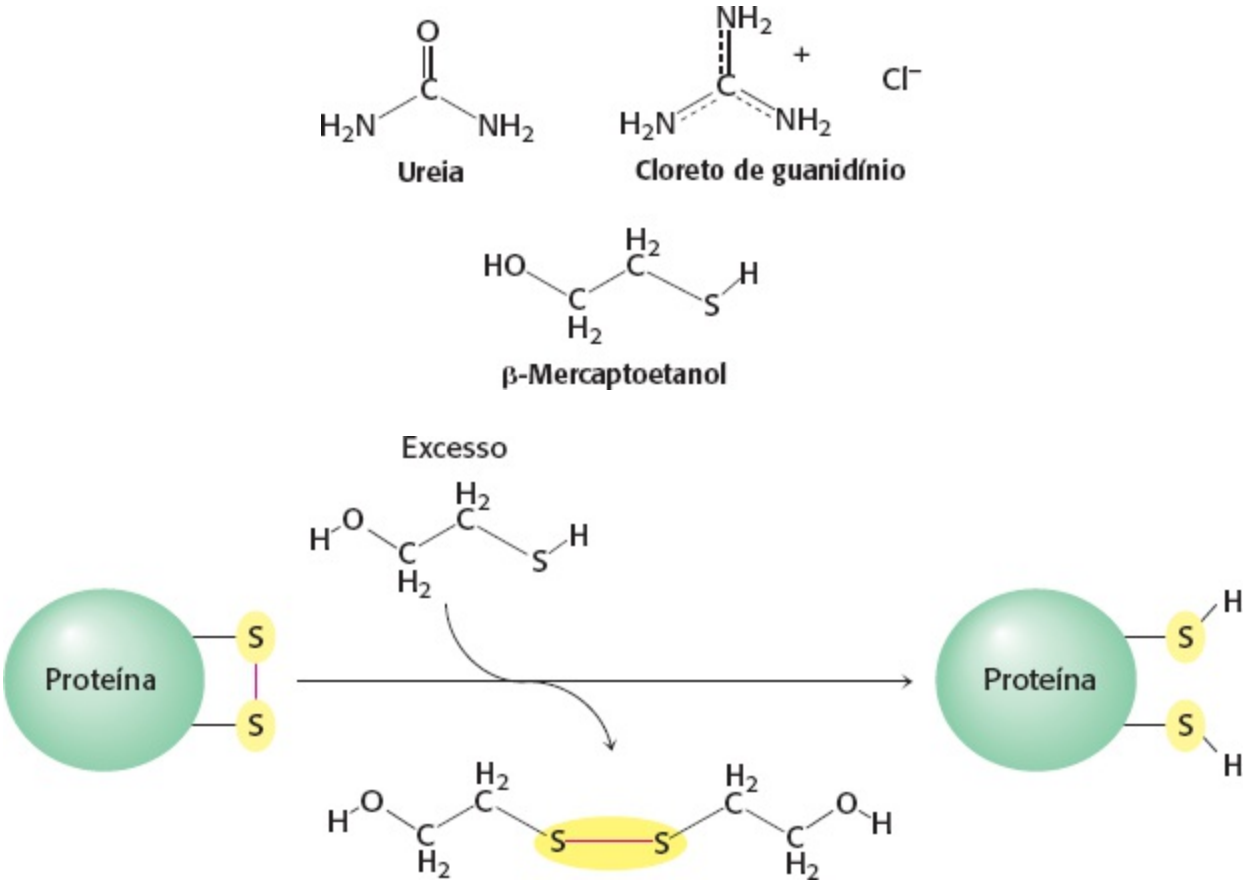


Figura 2.52 Papel do β-mercaptoetanol na redução das pontes dissulfeto. Observe que, à medida que os dissulfetos são reduzidos, o β-mercaptoetanol é oxidado e forma dímeros.

A maioria das cadeias polipeptídicas isentas de interligações adquire uma *conformação aleatória* em ureia a 8 M ou cloreto de guanidínio a 6 M. Quando a ribonuclease foi tratada com β-mercaptoetanol em 8 M de ureia, o produto foi uma cadeia polipeptídica completamente reduzida que adquiriu uma conformação aleatória e *sem atividade enzimática.* Quando uma proteína é convertida em um peptídio de conformação aleatória sem sua atividade normal, ela é considerada *desnaturada* (Figura 2.53).

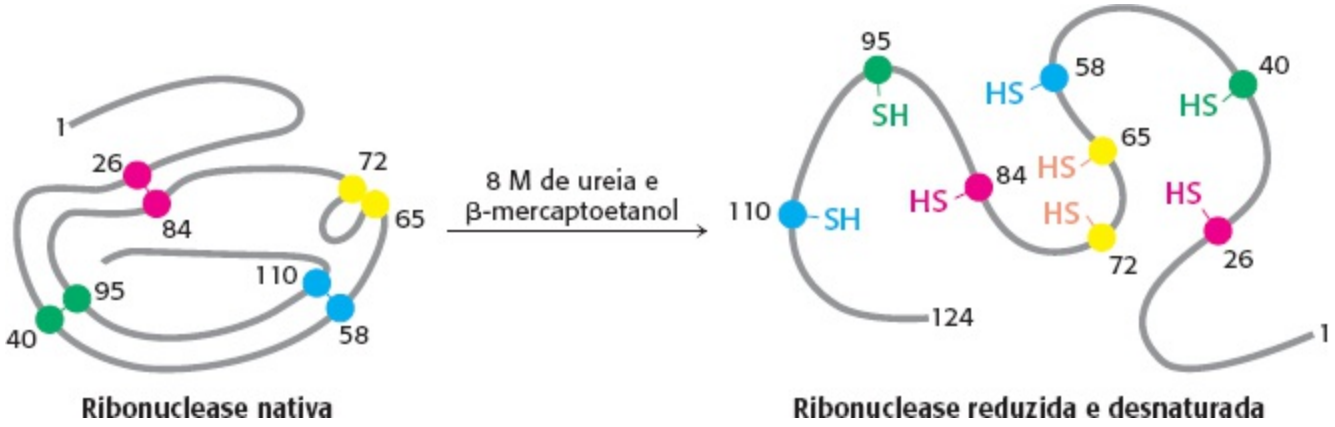


Figura 2.53 Redução e desnaturação da ribonuclease.

Anfinsen observou então que, livrando-se da ureia e do β-mercaptoetanol, por diálise, a ribonuclease desnaturada lentamente readquiria sua atividade enzimática. Ele imediatamente percebeu o significado desta descoberta ao acaso: os grupos sulfidrila da enzima desnaturada se oxidaram com o ar e a enzima espontaneamente se reestruturou em uma forma catalítica ativa. Pesquisas detalhadas mostraram então que quase toda a atividade enzimática original da enzima era restaurada se os grupos sulfidrila fossem oxidados em condições adequadas. Todas as propriedades físico-químicas mensuradas da enzima reestruturada eram praticamente idênticas às da enzima nativa. Estes experimentos mostraram que *a informação necessária para especificar a estrutura cataliticamente ativa da ribonuclease está contida em sua sequência de aminoácidos.* Estudos subsequentes estabeleceram a generalidade deste princípio central da bioquímica: *a sequência especifica a conformação.* A dependência da conformação na sequência é especialmente significativa por conta da íntima relação entre conformação e função.

Um resultado bem diferente foi obtido quando a ribonuclease reduzida foi reoxidada enquanto ainda se encontrava em 8 M de ureia e a solução foi então dialisada para a remoção da ureia. A ribonuclease reoxidada desta forma tinha apenas 1% da atividade enzimática da proteína nativa. Por que resultados tão diferentes foram obtidos quando a ribonuclease reduzida foi reoxidada na presença ou na ausência de ureia? A razão desta diferença é que os dissulfetos estabeleceram pares errados em meio à ureia. Há 105 maneiras diferentes de as oito moléculas de cisteína parearem para formar os quatro dissulfetos; apenas uma destas combinações é enzimaticamente ativa. As enzimas com os 104 pareamentos errados foram pitorescamente chamadas de ribonucleases "embaralhadas". Anfinsen descobriu que a ribonuclease embaralhada se convertia espontaneamente em ribonuclease nativa, completamente ativa, quando pequenas quantidades de β-mercaptoetanol eram adicionadas a uma solução aquosa da proteína (Figura 2.54). O β-mercaptoetanol adicionado catalisava a reorganização do pareamento de dissulfetos até que a estrutura nativa era obtida em cerca de 10 h. *Este processo era dirigido pela queda de energia livre, à medida que as conformações*

embaralhadas eram convertidas nas conformações estáveis, nativas, da enzima. Os pareamentos nativos de dissulfetos da ribonuclease contribuem então para a estabilização da estrutura termodinamicamente preferida.

Experimentos semelhantes de renaturação foram realizados com muitas outras proteínas. Em muitos casos, a estrutura nativa pode ser gerada dadas as condições apropriadas. Para outras proteínas, no entanto, a renaturação não ocorre de maneira eficiente. Nestes casos, as moléculas da proteína desnaturada ficam emaranhadas umas às outras e formam agregados. Dentro das células, proteínas chamadas *chaperonas* bloqueiam tais interações indevidas. Além disso, está agora evidente que algumas proteínas não adquirem uma estrutura definida até que interajam com parceiros moleculares, como veremos em breve.

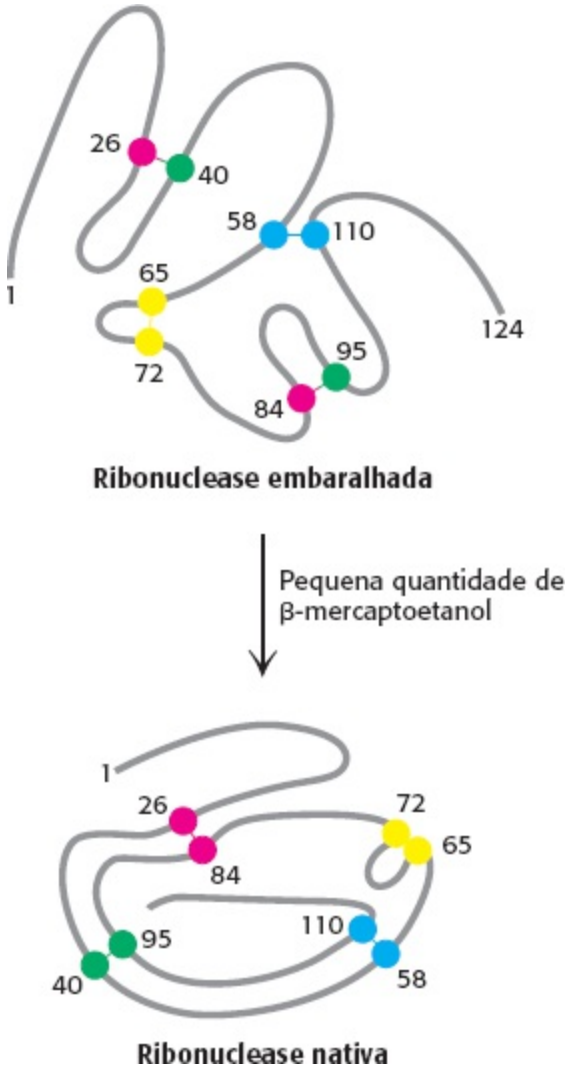


Figura 2.54 Restabelecendo o pareamento dissulfeto correto. A ribonuclease nativa pode ser reformada a partir da ribonuclease embaralhada na presença de pequenas quantidades de β-mercaptoetanol.

Os aminoácidos têm diferentes tendências para formarem alfa-hélices, folhas e voltas beta

Como a sequência de aminoácidos de uma proteína pode especificar sua estrutura tridimensional? Como uma cadeia polipeptídica desnovelada pode adquirir a forma de uma proteína nativa? Estas questões fundamentais da bioquímica podem ser abordadas por meio da uma pergunta mais simples: o que determina se uma sequência em particular em uma proteína forma uma α-hélice, uma fita β ou

uma volta? Uma fonte de inspiração é a observação da frequência de ocorrência de resíduos específicos de aminoácidos nestas estruturas secundárias (Tabela 2.3). Resíduos como alanina, glutamato e leucina tendem a estar presentes em α-hélices, enquanto a valina, e a isoleucina tendem a estar presentes em fitas β. A glicina, a asparagina e a prolina são mais propensas a ter voltas.

Estudos de proteínas e peptídios sintéticos revelaram algumas razões destas preferências. A α-hélice pode ser considerada a conformação padrão. A ramificação no átomo de carbono β, como na valina, na treonina e na isoleucina tende a desestabilizar as α-hélices em decorrência das colisões estéricas. Estes resíduos são prontamente acomodados nas folhas β, nas quais suas cadeias laterais projetam para fora do plano que contém a cadeia principal. A serina, o aspartato e a asparagina tendem a desestabilizar as α-hélices porque suas cadeias laterais contêm doadores e aceptores de pontes de hidrogênio bem próximos à cadeia principal, competindo desta maneira pelos grupos NH e CO desta cadeia. A prolina tende a desestabilizar tanto a α-hélice quanto a fita β porque não tem um grupo NH e porque a estrutura de seu anel restringe seu valor de ϕ a aproximadamente 60°. A glicina prontamente se encaixa em todas as estruturas e por esta razão não favorece a formação da hélice em particular.

Tabela 2.3 Frequências relativas dos resíduos de aminoácidos nas estruturas secundárias.

Aminoácido	α-hélice	Folha β	Volta reversa
Glu	1,59	0,52	1,01
Ala	1,41	0,72	0,82
Leu	1,34	1,22	0,57
Met	1,30	1,14	0,52
Gln	1,27	0,98	0,84
Lis	1,23	0,69	1,07
Arg	1,21	0,84	0,90
His	1,05	0,80	0,81
Val	0,90	1,87	0,41
Ile	1,09	1,67	0,47
Tyr	0,74	1,45	0,76
Cis	0,66	1,40	0,54
Trp	1,02	1,35	0,65
Phe	1,16	1,33	0,59
Ter	0,76	1,17	0,96

Gly	0,43	0,58	1,77
Asn	0,76	0,48	1,34
Pro	0,34	0,31	1,32
Ser	0,57	0,96	1,22
Asp	0,99	0,39	1,24

Nota: Os aminoácidos estão agrupados de acordo com suas preferências para α-hélice (grupo do topo), folhas β (grupo do meio) ou voltas (grupo da base).
Fonte: T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties,* 2nd ed. (W. H. Freeman and Company, 1992), p.256.

Podemos predizer a estrutura secundária de uma proteína utilizando este conhecimento sobre as preferências conformacionais dos resíduos de aminoácidos? Predições acuradas sobre a estrutura secundária adotada mesmo por uma cadeia polipeptídica pequena provaram ser difíceis. Qual o obstáculo de uma predição mais exata? Observe que as preferências conformacionais de um aminoácido não são claramente indicadas para uma estrutura (Tabela 2.3). Por exemplo, o glutamato, um dos mais importantes integrantes de α-hélice, prefere a α-hélice à fita β apenas por um fator de dois. As razões de preferência da maioria dos outros resíduos é menor. De fato, observou-se que algumas sequências de penta e hexa peptídios adotam uma estrutura em uma proteína e outra estrutura completamente diferente em outra proteína (Figura 2.55). Desta maneira, algumas sequências de aminoácidos por si sós não determinam a estrutura secundária. As interações terciárias – interações entre os resíduos que estão distantes uns dos outros na sequência – podem ser decisivas na especificação da estrutura secundária de alguns segmentos. O contexto é geralmente crucial na determinação do resultado conformacional. A conformação de uma proteína evoluiu para funcionar em um contexto ou ambiente em particular. Melhorias substanciais na predição das estruturas secundárias podem ser obtidas utilizando famílias de sequências relacionadas, em que cada uma adota a mesma estrutura.

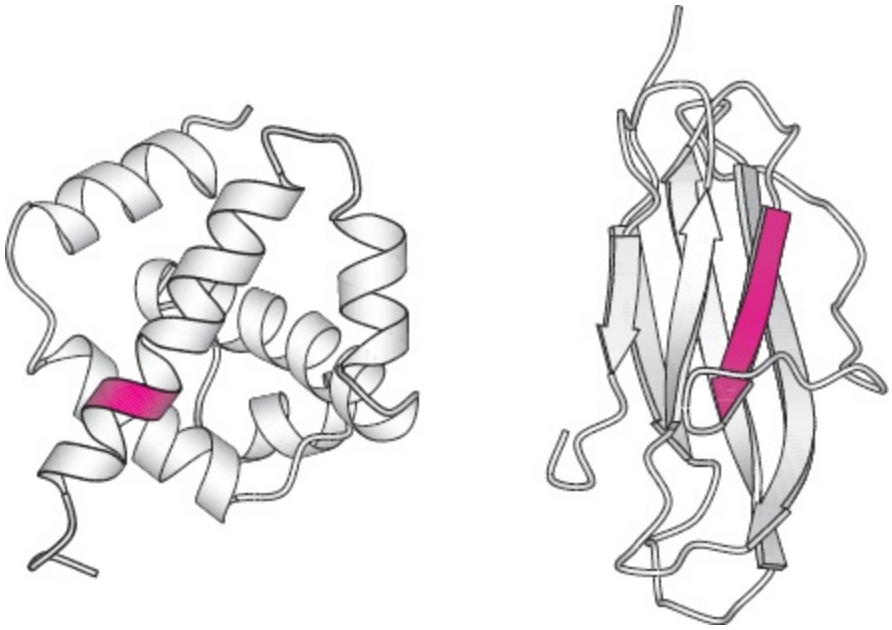


Figura 2.55 Conformações alternativas de uma sequência peptídica. Muitas sequências podem adotar conformações

alternativas em diferentes proteínas. Aqui a sequência VDLLKN mostrada em vermelho assume a conformação de uma α-hélice em uma proteína (esquerda) e uma fita β em outra (direita). [Desenhada a partir de 3WRP.pdb (esquerda) e 2HLA.pdb (direita).]

O enovelamento de proteínas é um processo altamente cooperativo

As proteínas podem ser desnaturadas por qualquer tratamento que seja capaz de quebrar as ligações frágeis que estabilizam a estrutura terciária, como o aquecimento, ou desnaturantes químicos, como a ureia ou cloreto de guanidínio. Para muitas proteínas, uma comparação do grau de desenovelamento quando se aumenta a concentração do agente desnaturante revela uma transição nítida entre a forma enovelada, ou ativa, para a forma desenovelada, ou desnaturada, sugerindo que apenas estes dois estados conformacionais estão significativamente presentes (Figura 2.56). Uma transição igualmente nítida é observada se agentes desnaturantes são removidos das proteínas desnaturadas, permitindo sua renaturação.

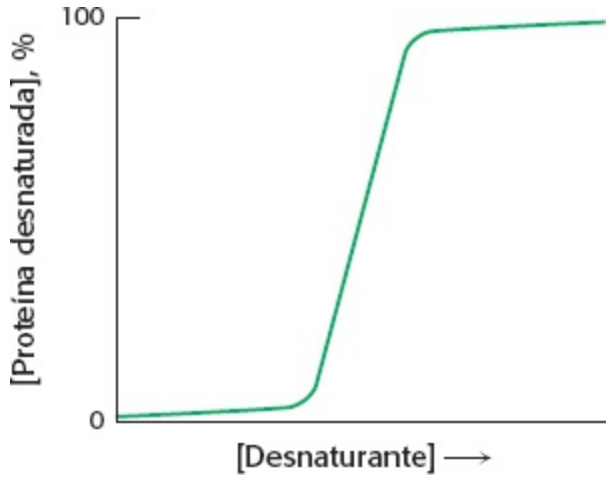


Figura 2.56 Transição do estado enovelado para o desnaturado. A maioria das proteínas exibe uma nítida transição da forma enovelada para a desnaturada quando tratadas com quantidades crescentes de agentes desnaturantes.

A nítida transição vista na Figura 2.56 sugere que o enovelamento e a desnaturação de proteínas é um *processo "tudo ou nada"* que ocorre em função de uma *transição cooperativa*. Por exemplo, suponha que uma proteína seja colocada em condições nas quais alguma parte de sua estrutura esteja termodinamicamente instável. À medida que esta parte da proteína seja desnovelada, as interações entre ela e o resto da proteína serão perdidas. A perda destas interações, por sua vez, desestabilizará o restante de toda a estrutura. Desta maneira, condições que levam à quebra de qualquer parte da estrutura proteica provavelmente irão desenovelar a proteína completamente. As propriedades estruturais das proteínas fornecem uma clara lógica da transição cooperativa.

As consequências do enovelamento cooperativo podem ser ilustradas ao considerarmos o conteúdo de uma solução proteica sob condições correspondentes ao meio da transição entre as formas enovelada e desnovelada. Sob tais condições, a proteína está enovelada "pela metade". No entanto, a solução aparentará não ter moléculas parcialmente enoveladas, mas sim uma mistura 50/50 de moléculas completamente enoveladas e completamente desnaturadas (Figura 2.57). Embora a proteína possa aparentemente se comportar como se só existisse em dois estados, esta existência exclusiva de dois estados é uma impossibilidade sob o ponto de vista molecular. Mesmo reações simples passam por intermediários de reação, de modo que uma molécula complexa como uma

proteína não pode simplesmente alternar entre um estado completamente desnovelado para um estado nativo em uma etapa. Estruturas intermediárias transitórias e instáveis devem existir entre os estados nativo e desnaturado (p. 55). Determinar as características destas estruturas intermediárias é uma intensa área da pesquisa em bioquímica.

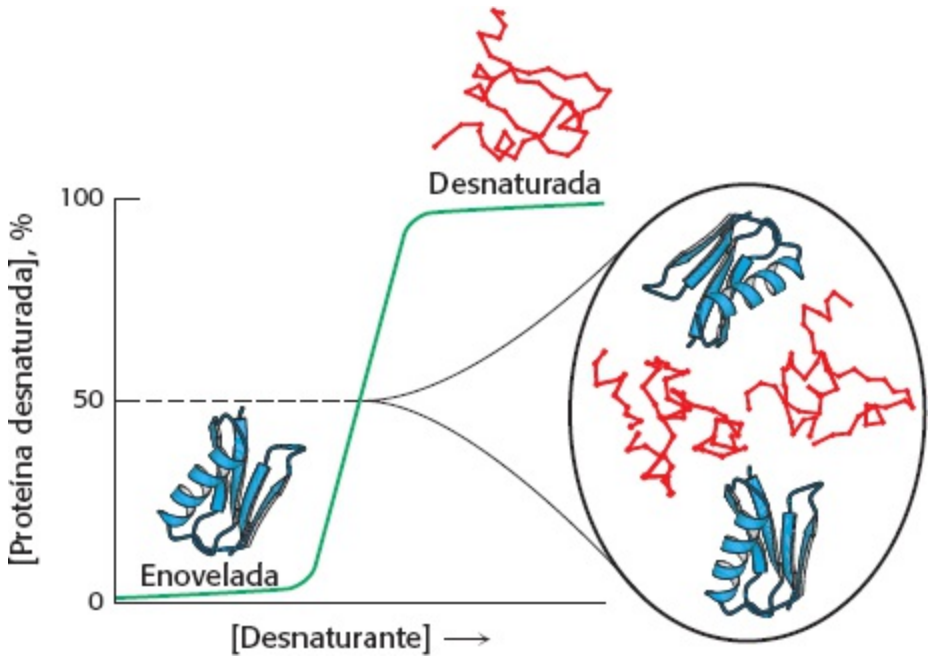


Figura 2.57 Componentes de uma solução proteica parcialmente desnaturada. Em uma solução de proteína semidesnaturada, metade das moléculas está completamente enovelada e a outra metade, completamente desnaturada.

As proteínas enovelam-se por meio de estabilização progressiva de intermediários, e não aleatoriamente

Como uma proteína passa pela transição entre uma estrutura desnovelada para uma conformação exclusiva na forma nativa? Uma possibilidade *a priori* seria que todas as conformações possíveis fossem tentadas até que a energeticamente mais favorável fosse encontrada. Quanto tempo duraria uma busca aleatória como esta? Considere uma pequena proteína com 100 resíduos. Cyrus Levinthal calculou que, se cada resíduo pudesse assumir três conformações diferentes, o número total de estruturas seria de 3^{100}, que é igual a 5×10^{47}. Se demorasse 10^{-13} s para converter uma estrutura em outra, o tempo total de busca seria $5 \times 10^{47} \times 10^{-13}$ s, que é igual a 5×10^{34} s ou $1{,}6 \times 10^{27}$ anos. Obviamente, demoraria demais mesmo para uma pequena proteína se enovelar apropriadamente tentando todas as possíveis conformações. A enorme diferença entre o tempo calculado e o tempo real de enovelamento é chamado de *paradoxo de Levinthal*. Este paradoxo claramente revela que as proteínas não se enovelam tentando todas as combinações possíveis; ao contrário, elas devem seguir pelo menos uma via de enovelamento parcialmente definida, constituída por intermediários entre a proteína completamente desnaturada e sua estrutura nativa.

A saída deste paradoxo é reconhecer o poder da *seleção cumulativa*. Richard Dawkins, em *O Relojoeiro Cego*, perguntou quanto tempo levaria para um macaco, mexendo aleatoriamente em uma máquina de escrever, reproduzir o comentário de Hamlet a Polônio: "Parece-me ser igual a uma doninha"* (Figura 2.58). Um número astronômico de digitações, da ordem de 10^{40}, seria necessário. No entanto, suponha que preservássemos cada letra correta e permitíssemos ao macaco redigitar apenas as letras incorretas. Neste caso, apenas alguns milhares de digitações, em média, seriam

necessárias. A diferença crucial entre estes casos é que o primeiro utiliza uma busca completamente aleatória, enquanto no segundo *intermediários parcialmente corretos são retidos*.

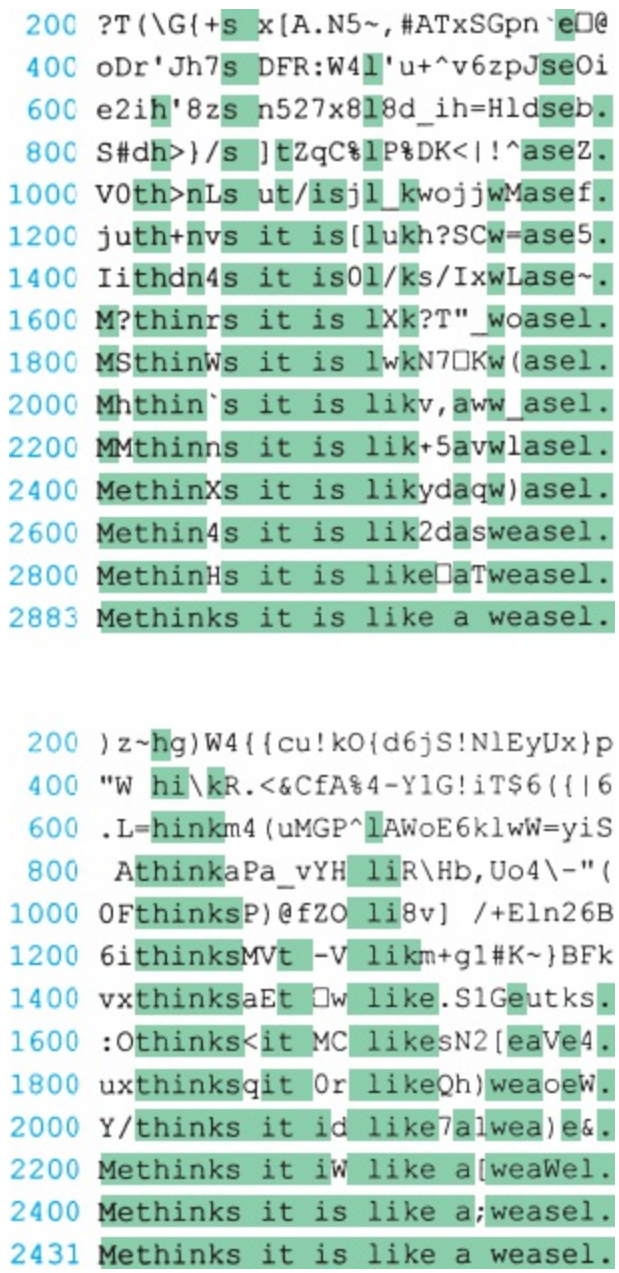


Figura 2.58 Analogia do macaco digitador. Um macaco, mexendo aleatoriamente em uma máquina de escrever, poderia escrever uma linha de Hamlet, de Shakespeare, desde que cada digitação correta fosse mantida. Nas duas simulações computadorizadas mostradas, o número cumulativo de digitações é dado à esquerda de cada linha.

O fundamento do enovelamento proteico é a tendência a reter os intermediários parcialmente corretos. No entanto, o problema do enovelamento das proteínas é muito mais difícil que aquele apresentado por nosso macaco shakespeariano. Primeiramente, o critério de correção não é uma avaliação resíduo a resíduo feita por um observador onisciente, mas a energia livre total das formas transitórias. Em segundo lugar, as proteínas são apenas marginalmente estáveis. A diferença de energia livre entre os estados enovelado e desnovelado de uma típica proteína com 100 resíduos é de 42 kJ mol^{-1} (10 kcal mol^{-1}) e, desta maneira, cada resíduo contribui, em média, com apenas 0,42 kJ mol^{-1} (0,1 kcal mol^{-1}) de energia para manter o estado enovelado. Esta quantidade é menor que a quantidade de energia térmica, que é de 2,5 kJ mol^{-1} (0,6 kcal mol^{-1}) em temperatura ambiente. Esta ínfima energia de estabilização implica que intermediários corretos, especialmente aqueles formados

no início do enovelamento, podem ser perdidos. A analogia é tal qual considerar que o macaco estaria livre para desfazer suas digitações corretas. No entanto, as interações que levam ao enovelamento cooperativo podem estabilizar os intermediários à medida que a estrutura se forma. Assim, regiões locais que têm preferência estrutural significativa, embora não estáveis por si, tenderão a adotar suas estruturas mais favorecidas e, à medida que se formam, podem interagir com outra, levando à estabilização crescente. Este arcabouço conceitual é geralmente conhecido como *modelo de nucleação-condensação*.

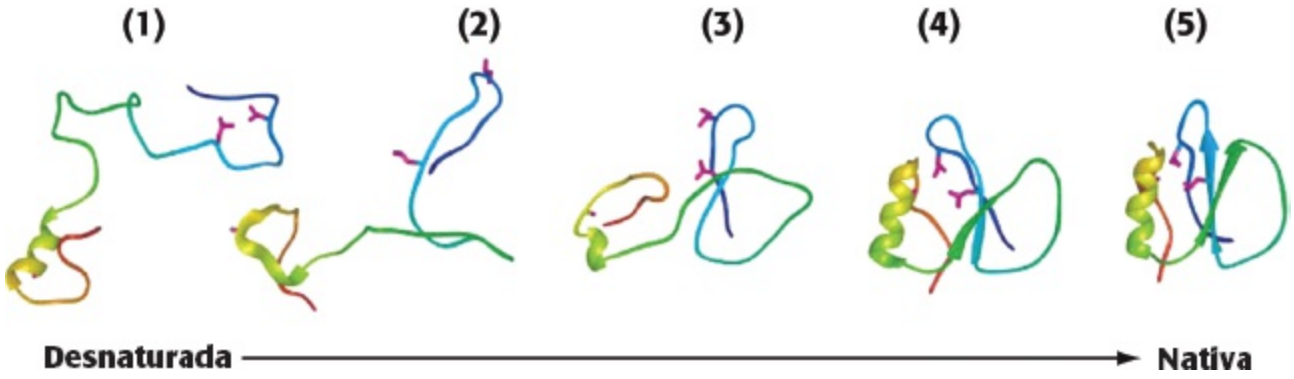


Figura 2.59 Via de enovelamento proposta para o inibidor da quimiotripsina. Regiões locais com preferências estruturais suficientes tendem a adotar suas estruturas preferidas inicialmente (1). Estas estruturas se reúnem para formar um núcleo com uma estrutura ainda móvel, porém, semelhante à nativa (4). A estrutura então se condensa completamente para formar a estrutura nativa, mais rígida (5). [Desenhada a partir de A. R. Fersht e V. Daggett. *Cell*, 109:573-582, 2002; com a permissão da Elsevier.]

Uma simulação do enovelamento de uma proteína, com base no modelo de nucleação-condensação, é mostrada na Figura 2.59. Este modelo sugere que certas vias devem ser preferenciais. Embora a Figura 2.59 sugira uma via discreta, cada intermediário mostrado representa um conjunto de estruturas similares e assim a proteína segue uma via geral, em vez de uma via precisa, em sua transição do estado desnovelado ao nativo. A superfície de energia do processo geral do enovelamento da proteína pode ser visualizada como um funil (Figura 2.60). A borda larga do funil representa a ampla faixa de estruturas acessíveis ao conjunto de proteínas desnaturadas. À medida que a energia livre da população de moléculas de proteína diminui, as proteínas se movem para partes mais estreitas do funil e um número menor de conformações é acessível. Na base do funil está o estado enovelado com sua conformação bem definida. Muitas vias podem levar a esta mesma energia mínima.

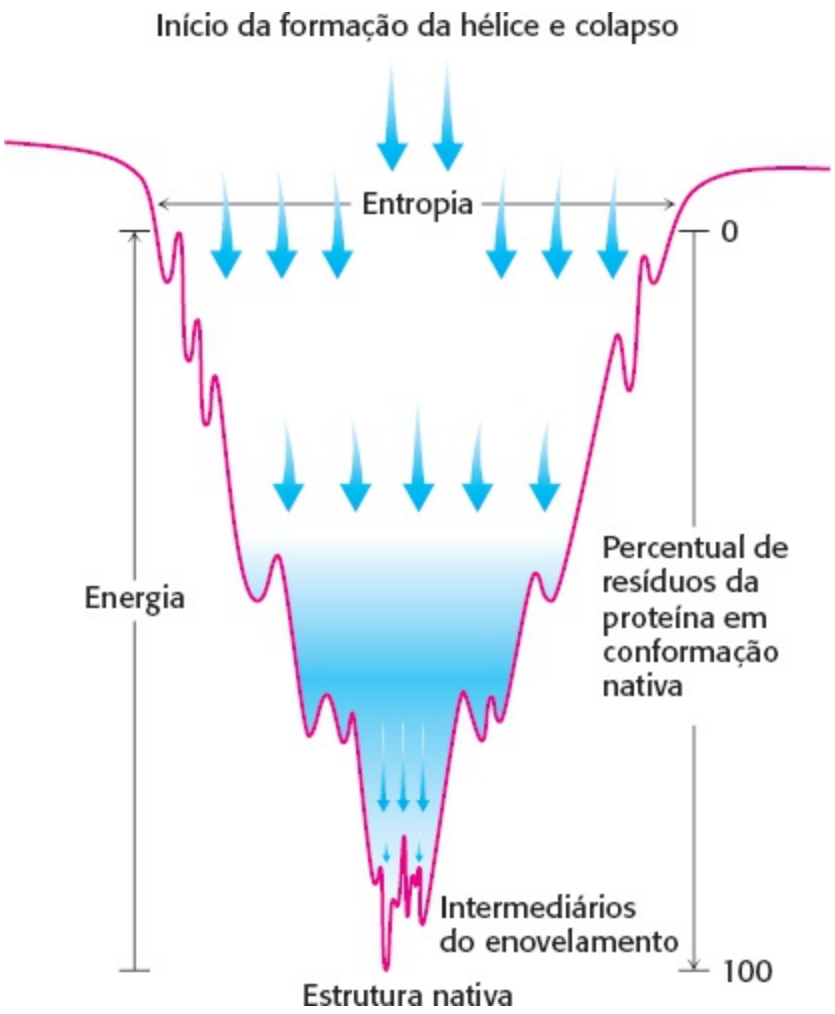


Figura 2.60 Funil de enovelamento. O funil de enovelamento representa a termodinâmica do enovelamento de proteínas. O topo do funil representa todas as conformações desnaturadas possíveis – ou seja, a máxima entropia conformacional. As depressões laterais do funil representam intermediários parcialmente estáveis que podem facilitar ou prejudicar a formação da estrutura nativa, de acordo com sua profundidade. As estruturas secundárias, como as hélices, formam-se e colapsam entre si para iniciar o enovelamento. [Desenhada a partir de D. L. Nelson e M. M. Cox, *Lehninger Principles of Bichemistry,* 5th ed. (W. H. Freeman and Company, 2008), p.143.]

A predição da estrutura tridimensional a partir da sequência de aminoácidos continua sendo um grande desafio

A predição da estrutura tridimensional a partir da sequência de aminoácidos mostrou ser extremamente difícil. Como vimos, a sequência local aparentemente determina apenas de 60 a 70% da estrutura secundária; interações de longa distância são necessárias para manter a estrutura secundária completa e a estrutura terciária.

Pesquisadores estão investigando duas abordagens completamente diferentes para predizer a estrutura tridimensional a partir das sequências dos aminoácidos. A primeira é a *predição ab initio* (do Latim, "do começo"), que tenta predizer o enovelamento de uma sequência de aminoácidos sem conhecimento prévio sobre sequências similares em estruturas de proteínas conhecidas. Cálculos computadorizados são utilizados para tentar minimizar a energia livre da estrutura com uma determinada sequência de aminoácidos ou para simular o processo de enovelamento. A utilidade destes métodos é limitada pelo vasto número de conformações possíveis pela pequena estabilidade de proteínas e pela energética irrisória das interações fracas em solução aquosa. A segunda abordagem beneficia-se do nosso crescente conhecimento sobre as estruturas tridimensionais de

muitas proteínas. Nestes *métodos baseados em conhecimento*, uma sequência de aminoácidos de uma estrutura desconhecida é examinada para verificar sua compatibilidade com estruturas de proteínas ou fragmentos conhecidos. Se uma correspondência significativa for detectada, a estrutura conhecida pode ser usada como um modelo inicial. Métodos fundamentados em conhecimento têm sido fontes de muitas ideias sobre a conformação tridimensional de proteínas que têm sequências conhecidas, mas estruturas desconhecidas.

Algumas proteínas não têm estruturas intrínsecas e podem existir em múltiplas conformações

A discussão sobre o enovelamento de proteínas baseia-se em grande parte no paradigma de que uma determinada sequência de aminoácidos se enovelará em uma estrutura tridimensional em particular. Este paradigma é bem estabelecido para muitas proteínas, como enzimas e proteínas transportadoras. No entanto, já é sabido há algum tempo que algumas proteínas podem adotar duas estruturas diferentes, uma destas responsável por agregação proteica e patologias (p. 57). Estas estruturas alternativas que se originam a partir de uma única sequência de aminoácidos eram consideradas raras, a exceção do paradigma. No entanto, trabalhos recentes questionaram a universalidade da ideia de que cada sequência de aminoácidos dá origem a uma estrutura para algumas proteínas, mesmo em condições de células fisiológicas.

Nosso primeiro exemplo é uma classe de proteínas conhecida como *proteínas intrinsecamente desestruturadas* (PID). Como o nome sugere, estas proteínas, completamente ou em parte, não têm uma estrutura tridimensional específica em condições fisiológicas. De fato, cerca de 50% das proteínas eucarióticas têm pelo menos uma região desestruturada maior que 30 aminoácidos de comprimento. Regiões desestruturadas são ricas em aminoácidos polares e carregados com poucos resíduos hidrofóbicos. Estas proteínas assumem uma estrutura definida ao interagir com outras proteínas. Esta versatilidade molecular significa que uma proteína pode assumir estruturas diferentes e interagir com parceiros diferentes, resultando em funções bioquímicas diferentes. As PID parecem ser especialmente importantes na sinalização e nas vias regulatórias.

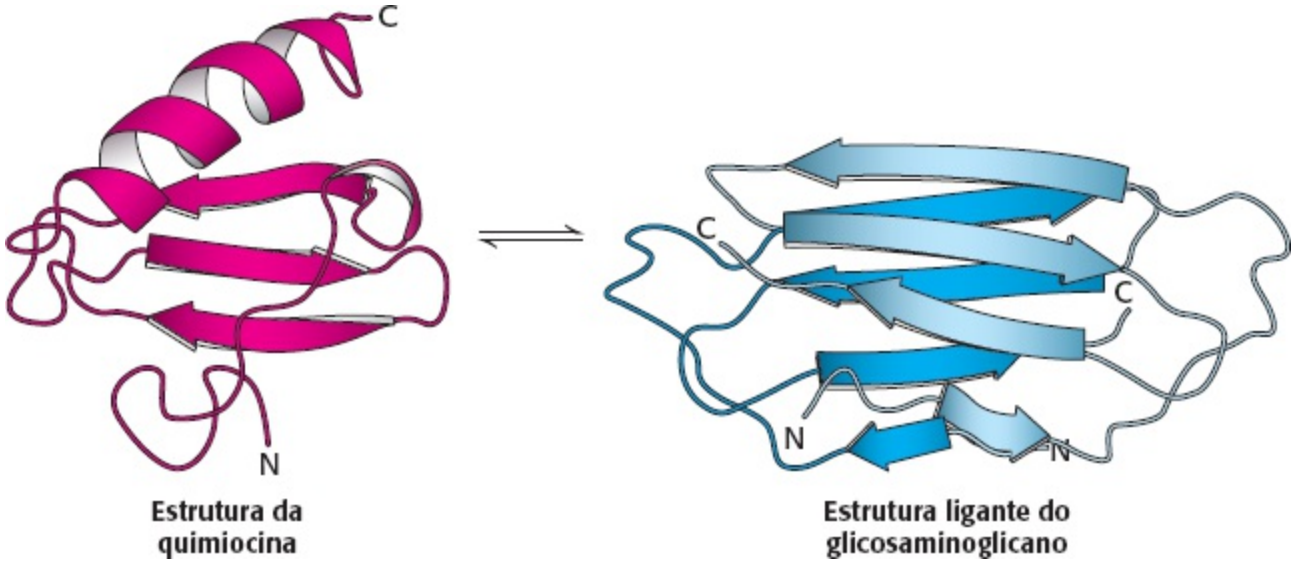


Figura 2.61 A linfotactina existe em duas conformações, em equilíbrio. [R. L. Tuinstra, F. C. Peterson, S. Kutlesa, E. S. Elgin, M. A. Kron e B. F. Volkman. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 105: 5057-5062, 2008, Fig. 2A.]

Outra classe de proteínas que não se encaixam no paradigma são as *proteínas metamórficas*. Parece que estas proteínas existem em um conjunto de estruturas de energias quase iguais que estão em equilíbrio. Pequenas moléculas ou outras proteínas podem se ligar a um membro em particular do conjunto, constituindo um complexo que tem uma função bioquímica que difere de outro complexo formado pela mesma proteína metamórfica ligada a um parceiro diferente. Um exemplo especialmente claro de proteína metamórfica é a citocina linfotactina. As citocinas são moléculas de sinalização do sistema imune, que se ligam a proteínas receptoras na superfície das células do sistema imune, estimulando a resposta imunológica. A linfotactina existe em duas estruturas bem diferentes, que estão em equilíbrio (Figura 2.61). A estrutura característica das quimiocinas é de uma folha β de três fitas e uma hélice carboxiterminal. Esta estrutura se liga ao seu receptor e o ativa. A estrutura alternativa é um dímero idêntico de folhas β. Quando nesta estrutura, a linfotactina se liga ao glicosaminoglicano, um carboidrato complexo (Capítulo 11). As atividades bioquímicas de cada estrutura são mutuamente exclusivas: a estrutura da citocina não pode se ligar ao glicosaminoglicano, e a estrutura em folha β não pode ativar o receptor. No entanto, notavelmente, ambas as atividades são necessárias para a atividade bioquímica completa da citocina.

Observe que as PID e as proteínas metamórficas expandem efetivamente a capacidade codificante do genoma. Em alguns casos, um gene pode codificar uma simples proteína que tem mais de uma estrutura e função. Estes exemplos ilustram também a natureza dinâmica do estudo da bioquímica e sua excitação inerente: mesmo ideias bem estabelecidas são geralmente sujeitas a modificações.

Erros no enovelamento e agregação de proteínas estão relacionados com algumas doenças neurológicas

A compreensão dos mecanismos de enovelamento correto e incorreto das proteínas transcende o interesse acadêmico. Um conjunto de patologias, incluindo doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington e as encefalopatias espongiformes transmissíveis (doenças de príons), relacionam-se com as proteínas incorretamente enoveladas. Todas estas doenças acarretam a deposição de agregados proteicos, chamados de *placas* ou *fibras amiloides*. Estas doenças são consequentemente chamadas de *amiloidoses*. Uma característica em comum das amiloidoses é que proteínas normalmente solúveis são convertidas em fibras insolúveis ricas em folhas β. A proteína corretamente enovelada é apenas marginalmente mais estável que a forma incorreta, mas a forma incorreta forma agregados, que são capazes de alterar a forma das proteínas corretamente enoveladas para a incorreta. Daremos particular atenção às encefalopatias espongiformes transmissíveis.

Uma das grandes surpresas da medicina moderna foi a descoberta de que certas doenças infecciosas do sistema nervoso eram transmitidas por agentes que se assemelhavam a vírus por seu tamanho, mas que consistiam apenas em proteínas. Estas doenças incluem a *encefalopatia espongiforme bovina* (chamada comumente de *doença da vaca louca)* e as doenças análogas em outros organismos, incluindo a *doença de Creutzfeldt-Jakob* (DCJ) em seres humanos, *paraplexia enzoótica* em ovelhas e a *doença da debilidade crônica* em cervos e alces. Os agentes etiológicos destas doenças são conhecidos como *príons*. Os príons são compostos, em sua maioria, ou completamente, por uma proteína células chamada de PrP, que está normalmente presente no cérebro, ainda que sua função não tenha sido identificada. De fato, camundongos sem PrP exibem fenótipos normais. O príons infecciosos são formas agregadas da proteína PrP chamadas de PrP^{SC}.

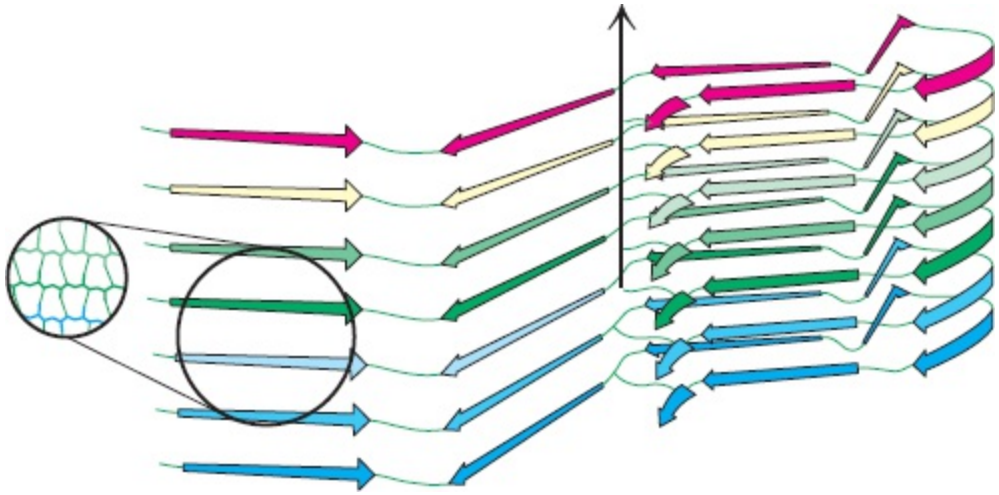


Figura 2.62 Modelo do príon humano: proteína amiloide. Um modelo detalhado da fibrila amiloide priônica humana, deduzido a partir dos estudos de espectroscopia por marcação do spin e ressonância paramagnética eletrônica (RPE), mostrou que a agregação proteica é devida à formação de grandes folhas β paralelas. As setas indicam o longo eixo da fibrila. [N. J. Cobb, F. D. Sönnichsen, H. Mchaourab e W. K. Surewicz. *Proc. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 18946-18951, 2007, Fig. 4E.]

Como a estrutura de uma proteína em sua forma agregada diferente daquela da proteína em seu estado normal no cérebro? A estrutura da proteína celular PrP normal contém grandes regiões de α-hélice e relativamente poucas estruturas em fitas β. A estrutura da forma da proteína presente em cérebros infectados, denominada PrP^{SC}, ainda não foi determinada por conta dos desafios implicados com sua natureza insolúvel e heterogênea. No entanto, há muitas evidências de que algumas partes destas proteínas que antes tinham conformações em α-hélice ou em alças foram convertidas em conformações de fitas β (Figura 2.62). As fitas β de monômeros altamente planares se empilham uma à outra, com suas cadeias laterais fortemente entrelaçadas. Uma visão lateral mostra a extensa rede de pontes de hidrogênio entre os monômeros. Estes agregados fibrosos de proteínas são geralmente chamados de formas *amiloides*.

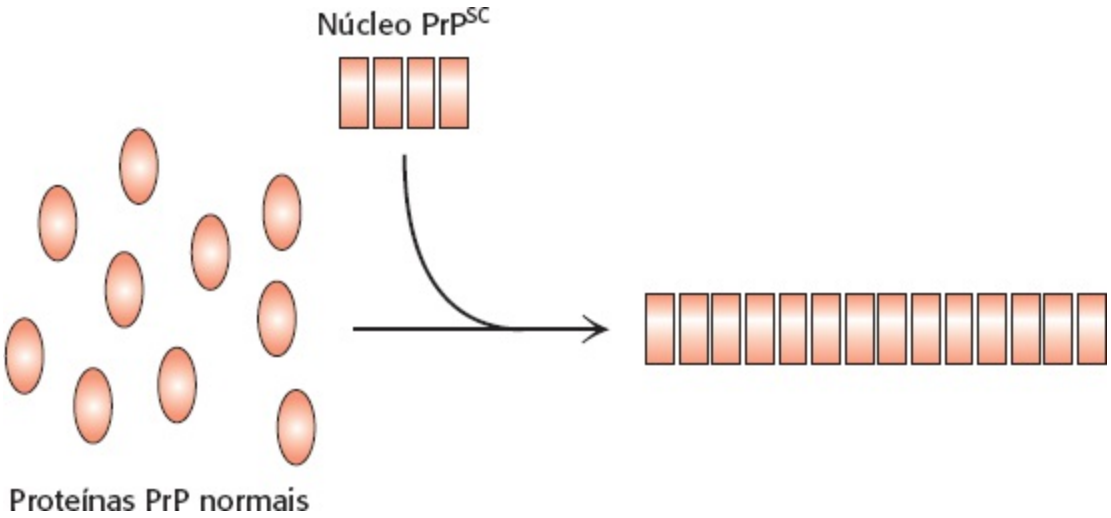


Figura 2.63 Modelo proteico de transmissão da doença priônica, conhecido como *protein-only*. Um núcleo, formado por proteínas em conformação anômala, cresce por meio da adição de proteínas normais.

Considerando que o agente infeccioso nas doenças de príons são formas agregadas de uma proteína que normalmente está presente no cérebro, um modelo para a transmissão da doença foi considerado (Figura 2.63). Os agregados proteicos feitos de formas anômalas da Prp agem como um

núcleo ao qual outras molécula de PrP aderem. As doenças priônicas podem assim ser transferidas de um organismo para outro, por meio da transmissão do núcleo de agregação, como provavelmente aconteceu na epidemia da doença da vaca louca, no Reino Unido, na década de 1990. O gado alimentado na ração animal que continha material proveniente dos animais infectados, por sua vez, também desenvolveu a doença.

As fibras amiloides também são vistas em cérebros de pacientes com certas doenças neurodegenerativas não infecciosas, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson. Por exemplo, os cérebros de pacientes com a doença de Alzheimer contêm agregados proteicos chamados de *placas amiloides* que são constituídos primariamente de um único polipeptídio chamado de Aβ. Este polipeptídio é derivado de uma proteína celula chamada de *proteína precursora de amiloide (APP)* mediante a ação de proteases específicas. O polipeptídio Aβ tem tendência a formar agregados. Apesar das dificuldades impostas pela insolubilidade da proteína, um modelo estrutural da Aβ foi obtido por meio de técnicas de RM que podem ser aplicadas aos sólidos, em vez de materiais em solução. Como esperado, a estrutura é rica em folhas β, as quais se reúnem para formar extensas estruturas paralelas em folhas β (Figura 2.63).

Como tais agregados levam à morte das células que os abrigam? A resposta ainda é controversa. Uma hipótese é a de que os grandes agregados não são tóxicos *per se*, mas os pequenos agregados das mesmas proteínas poderiam ser os culpados, provavelmente por conta de danos às membranas celulares.

Modificações e clivagens conferem novas propriedades às proteínas

As proteínas são capazes de realizar inúmeras funções que se baseiam apenas na versatilidade de seus 20 aminoácidos. Adicionalmente, muitas proteínas são modificadas covalentemente, por meio da adição de outros grupos que não apenas aminoácidos, para aumentar suas funções (Figura 2.64). Por exemplo, *grupos acetil* são ligados ao aminoterminal de muitas proteínas, uma modificação que faz com que estas proteínas fiquem mais resistentes à degradação. Como discutido anteriormente (p. 46), a adição de *grupos hidroxila* a muitos resíduos de prolina estabiliza a fibra do colágeno recém-sintetizado. A significância biológica desta modificação é evidente na patologia escorbuto: uma deficiência de vitamina C causa a hidroxilação insuficiente do colágeno e sua decorrente forma anormal é incapaz de manter a força normal dos tecidos. Outro aminoácido especializado produzido por um toque final é o γ-*carboxiglutamato*. Na deficiência de vitamina K, a carboxilação insuficiente do glutamato na protrombina, uma proteína da coagulação, pode levar à hemorragia (Capítulo 10). Muitas proteínas, especialmente aquelas que estão presentes na superfície das células ou são secretadas, adquirem *unidades de carboidrato* em resíduos específicos de asparagina (Capítulo 11). A adição de açúcares torna as proteínas mais hidrofílicas e capazes de participar em interações com outras proteínas. Ao contrário, a adição de *ácidos graxos* a um grupo α-amino ou a um grupo sulfidrila de um resíduo de cisteína, produz uma proteína mais hidrofóbica.

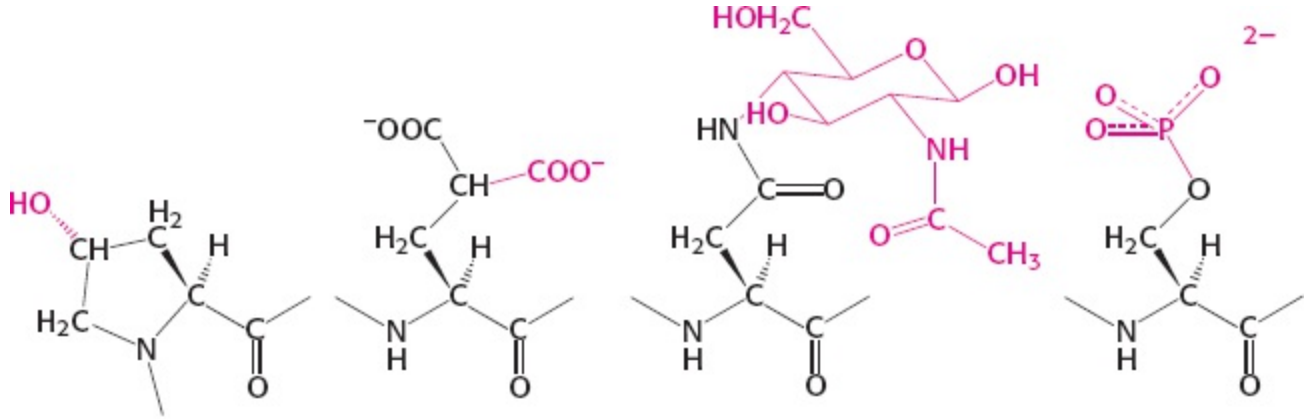


Figura 2.64 Toques finais. Algumas modificações covalentes importantes e comuns das cadeias laterais dos aminoácidos são mostradas.

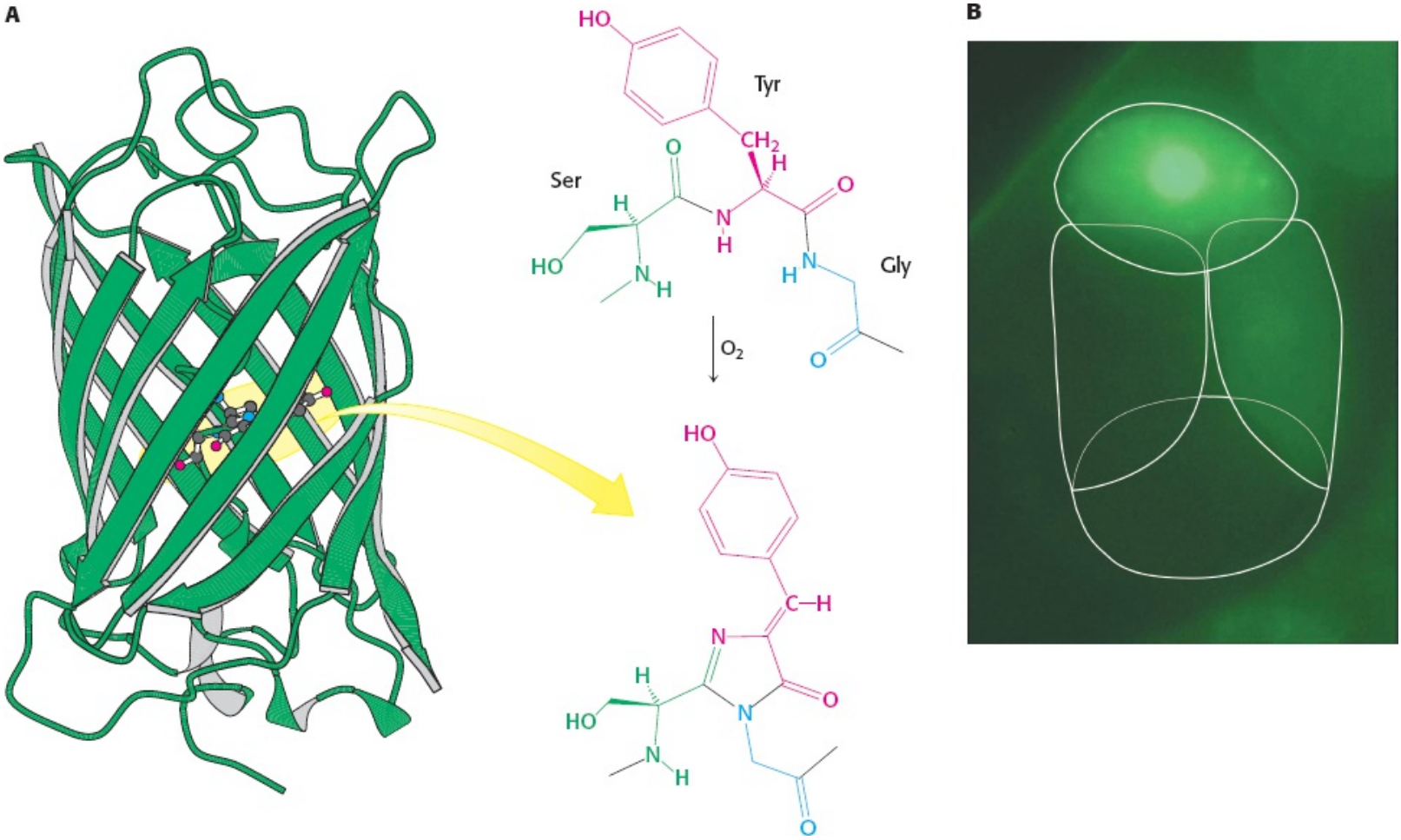


Figura 2.65 Rearranjo químico na GFP. A. A estrutura da proteína fluorescente verde (GFP). O rearranjo e a oxidação da sequência Ser-Tyr-Gly é a fonte da fluorescência. **B.** A micrografia de fluorescência de um embrião de quatro células (as células estão delineadas) do nematódeo *Caenorhabditis elegans* contendo uma proteína, a PIE-1, marcada com GFP. A proteína é expressa apenas na célula (topo) que dará origem à linhagem germinativa. [(A) Desenhada a partir de 1GFL.pdb; (B) cortesia do Dr. Geraldine Seydoux.]

Muitos hormônios, como a epinefrina (adrenalina), alteram a atividade enzimática por meio do estímulo à fosforilação dos aminoácidos hidroxilados serina e treonina; a *fosfoserina* e a *fosfotreonina* são aminoácidos os mais comumente modificados em proteínas. Fatores de crescimento como a insulina atuam desencadeando a fosforilação do grupo hidroxila dos resíduos de

tirosina, para formar a *fosfotirosina*. Os grupos fosforil destes três aminoácidos modificados são prontamente removidos; assim, os aminoácidos modificados são capazes de atuar como interruptores reversíveis na regulação de processos celulares. O papel da fosforilação na transdução do sinal será discutido extensivamente no Capítulo 14.

As modificações precedentes consistem na adição de grupos especiais aos aminoácidos. Outros grupos especiais são obtidos por meio de rearranjos químicos das cadeias laterais e, algumas vezes, do arcabouço peptídico. Por exemplo, certas águas vivas produzem uma proteína fluorescente verde (Figura 2.65). A fonte da fluorescência é um grupo formado pela oxidação e rearranjo espontâneo da sequência Ser-Tyr-Gly no centro da proteína. Esta proteína tem grande utilidade para pesquisadores, ela é utilizada como um marcador intracelular.

Finalmente, muitas proteínas são clivadas e aparadas após a síntese. Por exemplo, as enzimas digestivas são sintetizadas como precursores inativos que podem ser armazenados em segurança no pâncreas. Após sua liberação no intestino, estes precursores se tornam ativos por meio de clivagens peptídicas (Seção 10.4). Na coagulação sanguínea, uma clivagem peptídica converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel. Diversos hormônios polipeptídicos, como o hormônio adrenocorticotrófico, surgem a partir da quebra de uma grande proteína precursora única. Da mesma maneira, muitas proteínas virais são produzidas por meio da quebra de grandes precursores proteicos. Encontraremos muitos outros exemplos de modificações e clivagens como aspectos essenciais da função e formação das proteínas. De fato, estes toques finais são responsáveis por muitos aspectos da versatilidade, precisão e elegância da ação e regulação das proteínas.

Resumo

A estrutura das proteínas pode ser descrita em quatro níveis. A estrutura primária refere-se à sequência de aminoácidos. A estrutura secundária refere-se à conformação adotada por regiões locais na cadeia polipeptídica. A estrutura terciária descreve o enovelamento geral da cadeia polipeptídica. Finalmente, a estrutura quaternária se refere à associação específica de muitas cadeias de polipeptídios para formar complexos multissubunitários.

2.1 As proteínas são construídas a partir de um repertório de 20 aminoácidos

As proteínas são polímeros lineares de aminoácidos. Cada aminoácido consiste em um átomo de carbono central tetraédrico ligado a um grupo amino, a um grupo de ácido carboxílico, uma cadeia lateral específica e um átomo de hidrogênio. Estes centros tetraédricos, com a exceção da glicina, são quirais; apenas o isômero L existe nas proteínas naturais. Todas as proteínas naturais são construídas a partir do mesmo conjunto de 20 aminoácidos. As cadeias laterais destes 20 aminoácidos variam muito em tamanho, na forma e na presença de grupos funcionais. Elas podem ser agrupadas como se segue: (1) Cadeias laterais hidrofóbicas, incluindo os aminoácidos alifáticos – glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina e prolina – e cadeias laterais aromáticas – fenilalanina e triptofano; (2) cadeias laterais polares, incluindo cadeias laterais contendo hidroxilas – serina, treonina e tirosina; cisteína, com seu grupo sulfidrila; e cadeias laterais contendo carboxamida – asparagina e glutamina; (3) cadeias laterais básicas – lisina, arginina e histidina; (4) cadeias laterais ácidas – ácido aspártico e ácido glutâmico. Estes

agrupamentos são de certo modo arbitrários e muitos outros agrupamentos coerentes também são possíveis.

2.2 Estrutura primária | Os aminoácidos são unidos por ligações peptídicas para formar cadeias polipeptídicas

Os aminoácidos de uma cadeia polipeptídica são unidos por ligações amida formadas entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amina do próximo. Esta união, chamada de ligação peptídica, tem muitas propriedades importantes. Primeiramente, é resistente à hidrólise, de modo que as proteínas são notavelmente estáveis cineticamente. Em segundo lugar, o grupo peptídico é plano porque a ligação C—N tem uma característica de ligação dupla considerável. Em terceiro lugar, cada ligação peptídica tem tanto um doador (o grupo NH) quanto um aceptor (o grupo CO) de pontes de hidrogênio. As pontes de hidrogênio entre estes grupos da cadeia principal são uma característica importante da estrutura da proteína. Finalmente, a ligação peptídica não tem carga elétrica, o que permite às proteínas formarem estruturas globulares firmemente acondicionadas com grande parte de seu arcabouço imerso no interior da proteína. Por serem polímeros lineares, as proteínas podem ser descritas como sequências de aminoácidos. Tais sequências são escritas do terminal amínico para o terminal carboxílico.

2.3 Estrutura secundária | As cadeias polipeptídicas podem se enovelar em estruturas regulares como a alfa-hélice, a folha beta, voltas e alças

Os dois elementos principais da estrutura secundária são a α-hélice e a fita β. Na α-hélice, a cadeia polipeptídica se contorce em um bastão fortemente condensado. Dentro da hélice, o grupo CO de cada aminoácido estabelece uma ponte de hidrogênio com o grupo NH do aminoácido quatro resíduos na cadeia polipeptídica. Na fita β, a cadeia polipeptídica é quase completamente estendida. Duas ou mais fitas β conectadas por pontes de hidrogênio entre NH-CO se unem para formar as folhas β. As fitas nas folhas β podem ser antiparalelas, paralelas ou mistas.

2.4 Estrutura terciária | As proteínas hidrossolúveis enovelam-se em estruturas compactas com núcleos apolares

A estrutura compacta e assimétrica dos polipeptídios individuais é chamada de estrutura terciária. As estruturas terciárias de proteínas hidrossolúveis têm características em comum: (1) um interior formado por aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas e (2) uma superfície majoritariamente formada por aminoácidos hidrofílicos, que interagem com o ambiente aquoso. As interações hidrofóbicas entre os resíduos do interior são a força motriz para a formação da estrutura terciária das proteínas hidrossolúveis. Algumas proteínas que existem em ambientes hidrofóbicos, como nas membranas, exibem uma distribuição inversa dos aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos. Nestas proteínas, os aminoácidos hidrofóbicos estão na superfície para interagir com o ambiente, enquanto os grupos hidrofílicos estão protegidos do ambiente no interior da proteína.

2.5 Estrutura quaternária | As cadeias polipeptídicas podem se unir formando estruturas com múltiplas subunidades

Proteínas que consistem em mais de uma cadeia polipeptídica exibem estrutura quaternária. Cada

cadeia polipeptídica individual é chamada de subunidade. A estrutura quaternária pode ser tão simples como duas subunidades idênticas ou tão complexa quanto dúzias de subunidades diferentes. Na maior parte dos casos, as subunidades são mantidas unidas por ligações não covalentes.

2.6 A sequência de aminoácidos de uma proteína determina sua estrutura tridimensional

A sequência de aminoácidos determina a estrutura tridimensional e, portanto, todas as demais propriedades de uma proteína. Algumas proteínas podem ser completamente desnaturadas e ainda assim se renaturarem com eficiência quando postas em condições nas quais a forma enovelada da proteína é estável. A sequência de aminoácidos de uma proteína é determinada pela sequência de bases na molécula de DNA. Esta informação na sequência unidimensional é expandida ao mundo tridimensional pela capacidade das proteínas de se enovelarem espontaneamente. O enovelamento das proteínas é um processo altamente cooperativo; intermediários estruturais entre as formas desnovelada e enovelada não se acumulam.

Algumas proteínas, como as proteínas intrinsecamente desestruturadas e as metamórficas, não se incluem estritamente ao paradigma de "uma sequência, uma estrutura". Por conta desta versatilidade, estas proteínas aumentam a capacidade codificante de proteínas do genoma.

A versatilidade das proteínas aumenta ainda mais por meio das modificações covalentes. Tais modificações podem incorporar grupos funcionais que não estão presentes nos 20 aminoácidos. Outras modificações são importantes para a regulação da atividade da proteína. Por meio de sua estabilidade estrutural, diversidade e reatividade química, as proteínas tornam possível a maior parte dos processos-chave associados à vida.

Apêndice | Visualização de estruturas moleculares 2: proteínas

Alguns pesquisadores desenvolveram técnicas poderosas para a determinação das estruturas das proteínas, como será abordado no Capítulo 3. Na maioria dos casos, estas técnicas permitirão que as posições dos milhares de átomos na estrutura de uma proteína sejam determinadas. Os resultados finais destes experimentos incluem as coordenadas *x, y* e *z* de cada átomo na estrutura. Estas coordenadas são compiladas no Banco de Dados de Proteínas (http://www.pdb.org), a partir do qual podem ser rapidamente acessadas. Estas estruturas incluem milhares ou até mesmo dezenas de milhares de átomos. A complexidade das proteínas com milhares de átomos representa um desafio para a representação da sua estrutura. Diversas maneiras diferentes de representações são utilizadas para retratar as proteínas, cada uma com seus prós e contras. Os tipos que você verá com mais frequência neste livro são modelos de preenchimento espacial, em esferas e bastões, da cadeia principal, e os diagramas de fita. Quando apropriado, características estruturais de relevância ou importância particular serão notadas nas legendas das ilustrações.

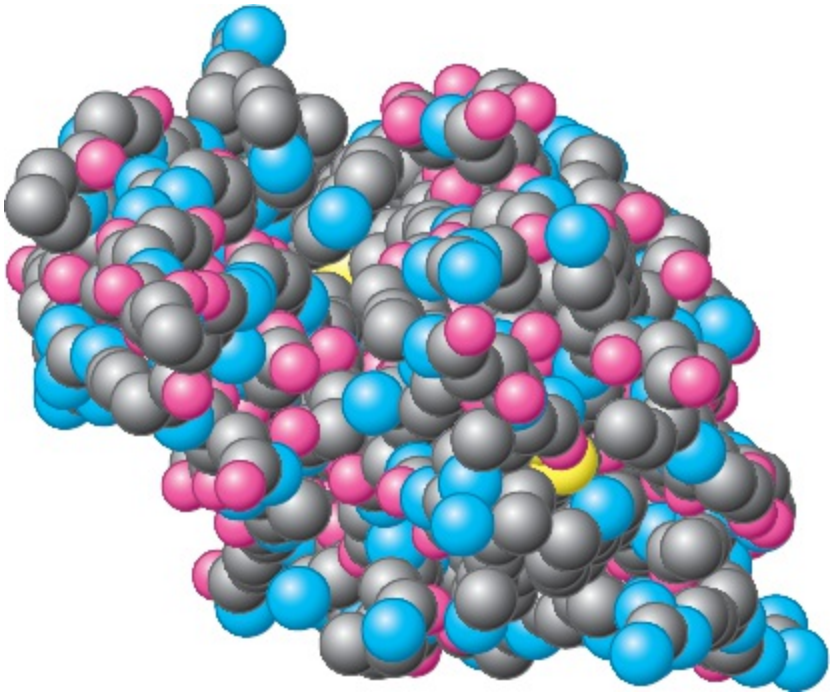


Figura 2.66 Modelo de preenchimento espacial da lisozima. *Observe* o quanto os átomos estão compactados, com pouco espaço disponível. Todos os átomos são mostrados, à exceção do hidrogênio. Os átomos de hidrogênio são geralmente omitidos porque suas posições não são prontamente determinadas por métodos de cristalografia de raios X e porque sua omissão de certo modo contribui para a clareza da representação da estrutura.

Modelos de preenchimento espacial

O modelo de preenchimento espacial é o tipo de representação mais realista. Cada átomo é mostrado como uma esfera com um tamanho correspondendo ao raio de van der Waals (Seção 1.3) do átomo. As ligações não são explicitamente mostradas, mas são representadas pela intersecção das esferas mostradas quando seus átomos estão mais próximos entre si do que a soma de seus raios van der Waals. Todos os átomos são mostrados, incluindo aqueles que constituem o arcabouço e aqueles das cadeias laterais. Um modelo de preenchimento espacial da lisozima é retratado na Figura 2.66.

Os modelos de preenchimento espacial fornecem uma percepção de como há pouco espaço vazio na estrutura de uma proteína, que sempre contém muitos átomos em contato van der Waals uns com os outros. Estes modelos são particularmente úteis para mostrar mudanças conformacionais em proteínas em circunstâncias diferentes. Uma desvantagem do modelo de preenchimento espacial é que as estruturas secundária e terciária da proteína são difíceis de ver. Assim, estes modelos não são muito efetivos para distinguir uma proteína de outra – muitos modelos de preenchimento espacial de proteínas são bastante similares.

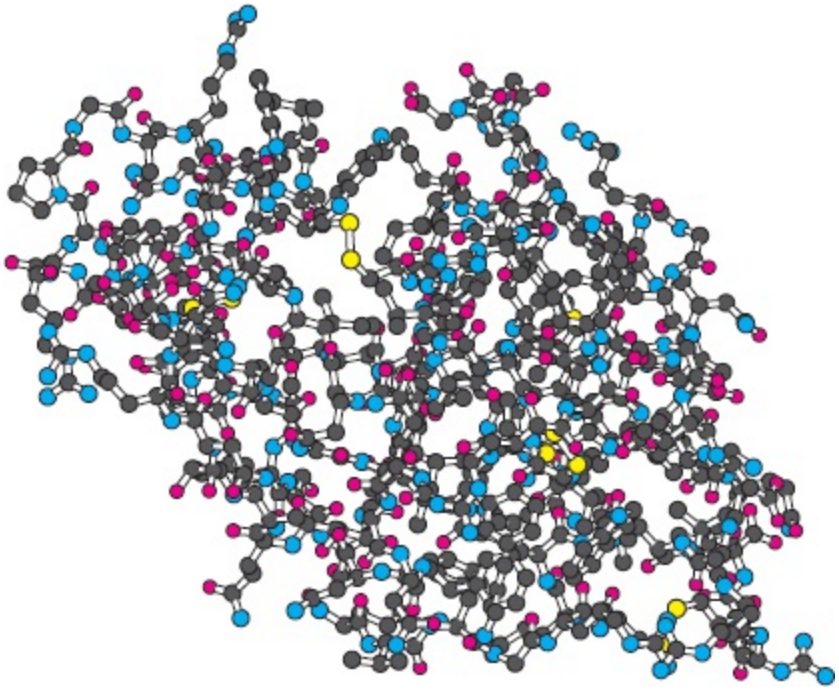


Figura 2.67 Modelo em esferas e bastões da lisozima. Novamente, os átomos de hidrogênio foram omitidos.

Modelos em esferas e bastões

Os modelos em esferas e bastões não são tão realistas quanto os modelos de preenchimento espacial. Os átomos retratados de maneira realista ocupam mais espaço, estabelecido por seus raios de van der Waals, do que os átomos retratados nos modelos em esferas e bastões. No entanto, a organização das ligações é mais facilmente visível, porque as pontes são explicitamente representadas como bastões (Figura 2.67). Um modelo em esfera e bastão revela uma estrutura complexa mais claramente do que o modelo de preenchimento espacial. No entanto, a representação é tão complicada que as características estruturais como as α-hélices ou potenciais sítios de ligação são de difícil discernimento.

Como os modelos de preenchimento espacial e em esfera e bastões representam as estruturas proteicas no nível atômico, o grande número de átomos em uma estrutura complexa torna difícil discernir as características estruturais relevantes. Desta maneira, representações que são mais esquemáticas – como os modelos de cadeia principal e os diagramas em fita – foram desenvolvidos para a representação de estruturas macromoleculares. Nestas representações, a maior parte dos átomos não é mostrada de maneira explícita.

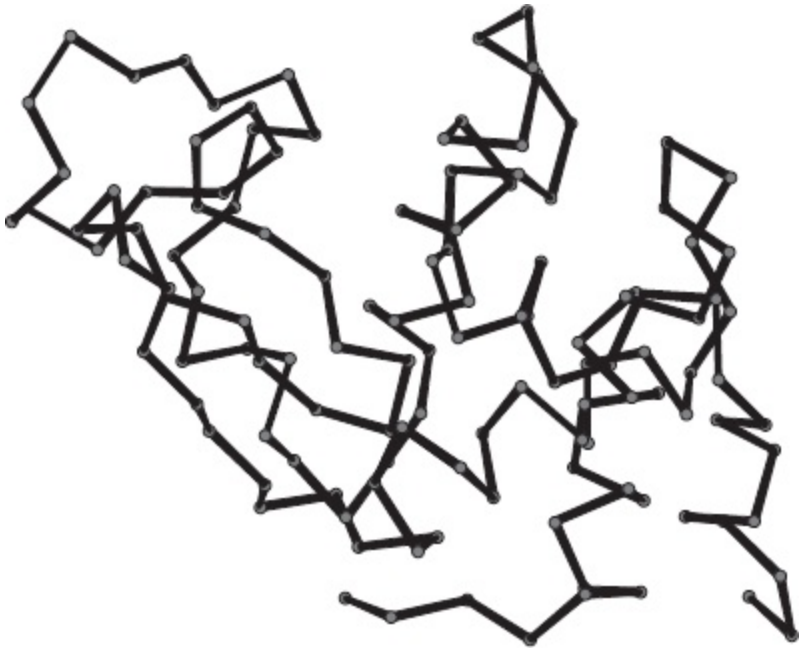


Figura 2.68 Modelo de cadeia principal da lisozima.

Modelos de cadeia principal

Os modelos de cadeia principal mostram apenas os átomos do arcabouço de um polipeptídio de uma molécula ou mesmo apenas o carbono α de cada aminoácido. Os átomos são unidos por linhas, que representam as ligações; se apenas os átomo de carbonos α são mostrados, as linhas conectam os carbonos α dos aminoácidos que estão adjacentes na sequência de aminoácidos (Figura 2.68). Neste livro, modelos de cadeia principal mostram apenas as linhas que conectam os átomos do carbono α; outros átomos de carbono não são representados.

Um modelo de cadeia principal mostra o curso geral de uma cadeia polipeptídica muito melhor do que um modelo de preenchimento espacial ou um modelo em esfera e bastão. No entanto, os elementos da estrutura secundária ainda são difíceis de ver.

Diagramas em fita

Os diagramas em fita são bem esquemáticos e mais comumente usados para destacar alguns aspectos específicos da estrutura proteica, como a α-hélice (representada como uma fita enrolada ou um cilindro), uma fita β (uma seta larga) e alças (tubos finos), para fornecer imagens claras dos padrões de enovelamento das proteínas (Figura 2.69). O diagrama em fita permite que o curso da cadeia polipeptídica seja acompanhado e prontamente exibe os elementos de estrutura secundária. Desta maneira, os diagramas em fita de proteínas que se relacionam uma com a outra por divergência evolutiva se assemelham (ver Figura 6.14), enquanto proteínas que não se relacionam são claramente diferentes.

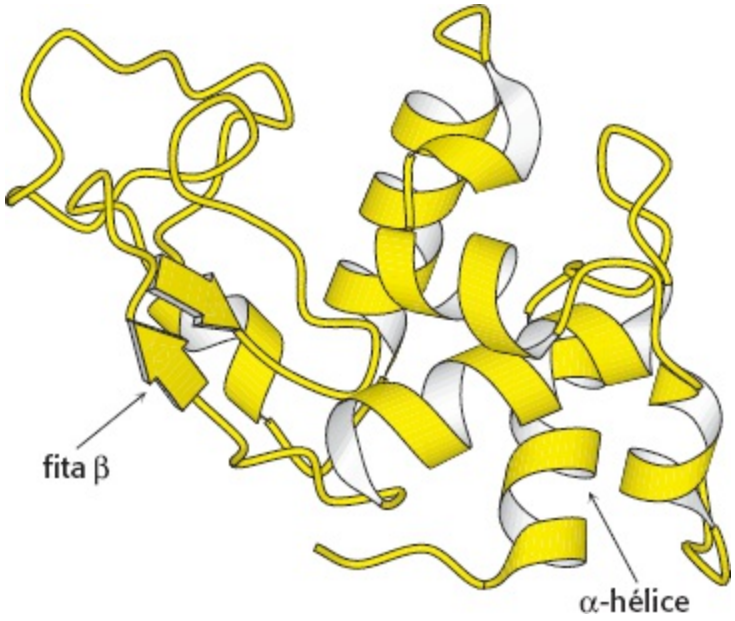


Figura 2.69 Diagrama em fita da lisozima. As α-hélices são mostradas como fitas enroladas; as fitas β são representadas como setas. Estruturas mais irregulares são mostradas como tubos finos.

Neste livro, as fitas enroladas serão usadas em geral para representar as α-hélices. No entanto, para as proteínas de membrana, que são geralmente muito complexas, usaremos cilindros, em vez de fitas enroladas. Esta convenção também fará com que as proteínas de membrana, com suas α-hélices que atravessam as membranas, sejam mais facilmente reconhecíveis (ver Figura 12.18).

Mantenha em mente que a aparência aberta e ampla de um diagrama em fita é enganosa. Como observado antes, a estrutura proteica é bastante compacta, tendo pouco espaço aberto. A abertura dos diagramas em fita faz deles particularmente úteis para destacar aspectos adicionais da estrutura da proteína. Sítios ativos, substratos, ligações e outros fragmentos estruturais podem ser incluídos nos modelos de esferas e bastões ou de preenchimento espacial em um diagrama em fita (Figura 2.70).

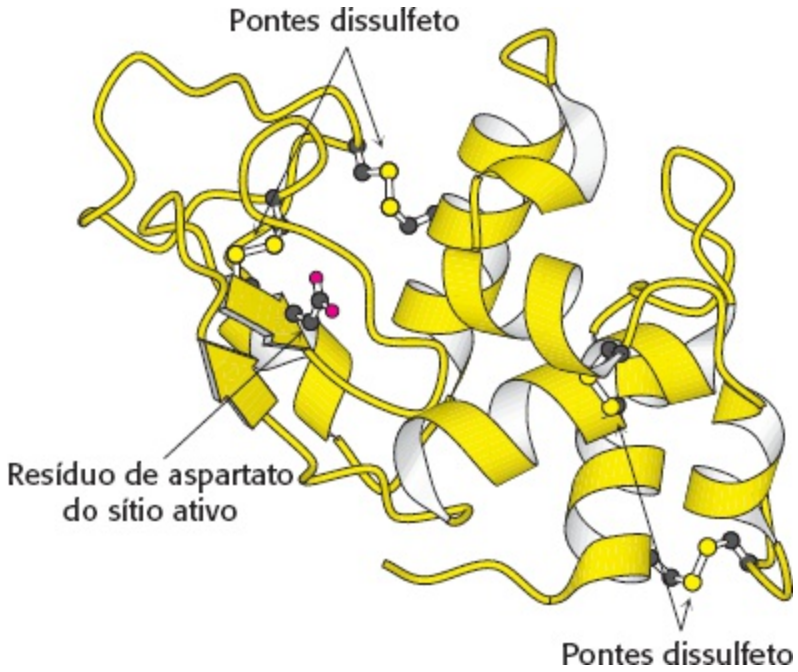


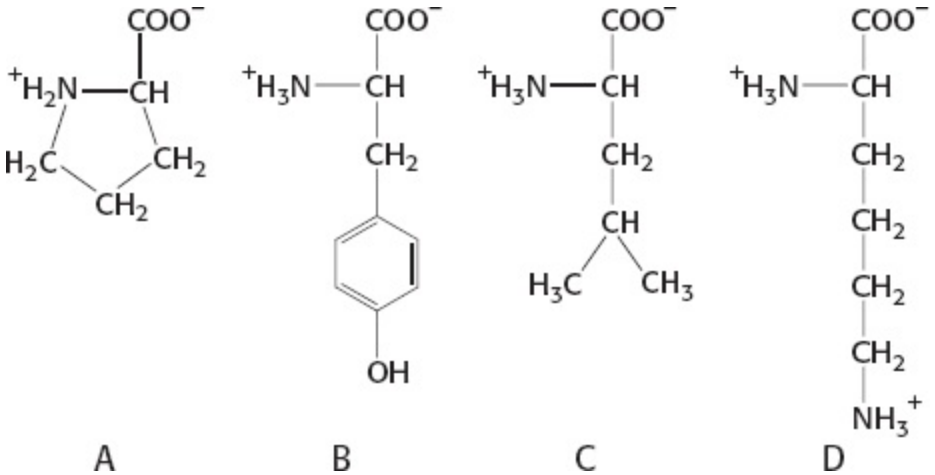
Figura 2.70 Diagrama em fita da lisozima com destaques. Quatro pontes dissulfeto e um resíduo funcionalmente importante de aspartato são mostrados na forma de esferas e bastões.

Palavras-chave

α-hélice (p. 40)
L aminoácido (p. 29)
ângulo de torção (p. 39)
ângulo phi (ϕ) (p. 39)
ângulo psi (ψ) (p. 39)
cadeia lateral (grupo R) (p. 29)
diagrama de Ramachandran (p. 39)
domínio (p. 49)
elevação (translação) (p. 41)
estrutura primária (p. 37)
estrutura quaternária (p. 50)
estrutura secundária (p. 40)
estrutura terciária (p. 47)
fita β (p. 43)
folha β pregueada (p. 42)
íon dipolar (zwitterion) (p. 29)
ligação peptídica (p. 35)
motivo (p. 49)
ponte dissulfeto (p. 36)
príon (p. 58)
proteína intrinsecamente desestruturada (p. 56)
proteína metamórfica (p. 57)
repetição em héptade (p. 45)
subunidade (p. 50)
super-hélice (p. 45)
transição cooperativa (p. 54)
volta reversa (volta β, volta em forma de U) (p. 44)

Questões

1. Identifique. Examine os quatro aminoácidos seguintes (A-D):



Quais são seus nomes, abreviações de três letras e símbolos de uma letra?

2. Propriedades. Utilizando os aminoácidos da questão anterior, quais são associados às seguintes características?

a) Cadeia lateral hidrofóbica _____

b) Cadeia lateral básica _____

c) Três grupos ionizáveis _____

d) pK_a de aproximadamente 10 em proteínas. _____

e) Forma modificada da fenilalanina _____

3. Combine. Combine cada aminoácido da coluna da esquerda com o tipo de cadeia lateral apropriado na coluna da direita.

a) Leu	(1) Contém hidroxila
b) Glu	(2) Ácido
c) Lis	(3) Básico
d) Ser	(4) Contém enxofre
e) Cis	(5) Aromático apolar
f) Trp	(6) Alifático apolar

4. Solubilidade. Em cada um dos seguintes pares de aminoácidos, identifique qual aminoácido seria mais solúvel em água:

a) Ala, Leu

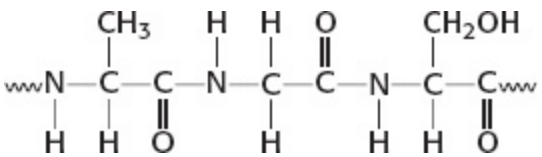
b) Tyr, Phe

c) Ser, Ala

d) Trp, His

5. Ponte de hidrogênio favorável. Qual dos seguintes aminoácidos têm grupos R com potencial de formação de pontes de hidrogênio? Ala, Gly, Ser, Phe, Glu, Tyr, Ile e Thr.

6. Nomeie os componentes. Examine o segmento da proteína abaixo:



a) Quais são os três aminoácidos presentes?

b) Dos três, qual é o aminoácido N-terminal?

c) Identifique as ligações peptídicas.

d) Identifique os átomos de carbono α.

7. Quem tem carga? Desenhe a estrutura do dipeptídio Gly-Hys. Qual é a carga do peptídio em pH 5,5? E em pH 7,5?

8. Sopa de letrinhas. Quantos polipeptídios diferentes com 50 aminoácidos de extensão podem ser

feitos pelos 20 aminoácidos comuns?

9. Predileção por doces, mas com consciência das calorias. O aspartame é um adoçante artificial, um dipeptídio composto por Asp-Phe no qual o terminal carboxílico foi modificado pela adição de um grupo metil. Desenhe a estrutura do aspartame em pH 7.

10. Proteínas vertebradas? O que quer dizer o termo *arcabouço (ou coluna vertebral) peptídico*?

11. Não é um carrinho lateral. Defina o termo *cadeia lateral* no contexto dos aminoácidos ou da estrutura das proteínas.

12. Um de muitos. Diferencie *composição de aminoácidos* de *sequência de aminoácidos*.

13. Forma e dimensão. (a) Tropomiosina, uma proteína muscular de 70 kDa, é uma super-hélice de duas α-hélices. Pressuponha a comprimento da molécula. (b) Suponha que um segmento de 40 resíduos de uma proteína se enovele em uma estrutura β com duas fitas antiparalelas e com uma alço em forma de u com 4 resíduos. Qual é a maior dimensão deste motivo?

14. Isômeros contrastantes. A poli-L-leucina em um solvente orgânico, como o dioxano, é constituída por α-hélices, enquanto a poli-L-isoleucina não o é. Por que estes aminoácidos com o mesmo número e tipos de átomos têm diferentes tendências de formação de hélice?

15. Ativo novamente. Descobriu-se que uma mutação que altera um resíduo de alanina para valina no interior de uma proteína leva à perda de atividade. No entanto, a atividade é ganha novamente quando uma segunda mutação em uma posição diferente altera uma isoleucina para uma glicina. Como esta segunda alteração pode levar à restauração da atividade?

16. Teste de aleatoriedade. Uma enzima que catalisa reações de troca entre dissulfetos-sulfidrilas, chamada de proteína dissulfeto isomerase (PDI), foi isolada. A PDI rapidamente converte ribonucleases desnaturadas e inativas em suas formas nativas. Ao contrário, a insulina é rapidamente inativada pela PDI. O que esta importante observação sugere sobre a relação entre a sequência de aminoácidos da insulina e sobre sua estrutura tridimensional?

17. Estirando um alvo. Uma protease é uma enzima que catalisa a hidrólise de ligações peptídicas em suas proteínas-alvo. Como pode uma protease se ligar a uma proteína-alvo de modo que sua cadeia principal se torne completamente estendida na vizinhança da ligação peptídica vulnerável a sua ação?

18. Geralmente insubstituível. A glicina é um resíduo altamente conservado na evolução das proteínas. Por quê?

19. Parceiros em potencial. Identifique os grupos em uma proteína que podem formar pontes de hidrogênio ou ligações eletrostáticas com uma cadeia lateral de arginina em pH 7.

20. Ondas permanentes. A forma do cabelo é determinada em parte pelo padrão de pontes dissulfeto na queratina, sua proteína principal. Como os cachos podem ser induzidos?

21. Localização é tudo 1. A maioria das proteínas tem exteriores hidrofílicos e interiores hidrofóbicos. Você esperaria que esta estrutura fosse aplicável às proteínas inseridas no interior hidrofóbico das membranas? Explique.

22. Localização é tudo 2. As proteínas que atravessam as membranas biológicas em geral têm α-hélices. Considerando que a face interna das membranas é altamente hidrofóbica (Seção 12.2), preveja quais aminoácidos poderiam estar em tais hélices. Por que é particularmente adequado que uma α-hélice exista no ambiente hidrofóbico do interior da membrana?

23. Pressão da vizinhança? A Tabela 2.1 mostra os valores típicos de pK_a para os grupos ionizáveis das proteínas. No entanto, mais de 500 valores de pK_a foram determinados para os grupos individuais em proteínas enoveladas. Explique a razão desta discrepância.

24. Talvez o tamanho seja importante. A osteogênese imperfeita exibe uma ampla gama de sintomas, de moderados a graves. Com base no seu conhecimento sobre os aminoácidos e a estrutura do colágeno, proponha uma base bioquímica para esta variedade de sintomas.

25. Questões de estabilidade. As proteínas são bem estáveis. A vida de uma ligação peptídica em solução aquosa é de aproximadamente 1.000 anos. No entanto, a energia livre da hidrólise das proteínas é negativa e bem grande. Como você explicaria a estabilidade da ligação peptídica, considerando que a hidrólise libera muita energia?

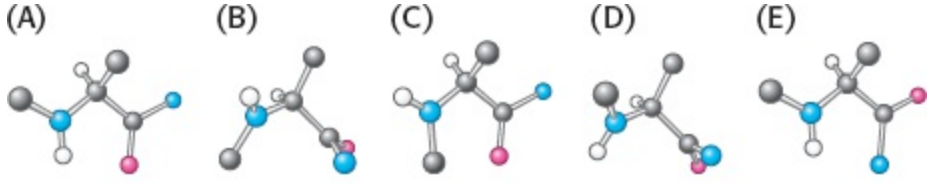
26. Espécies menores. Para um aminoácido como a alanina, a principal forma em uma solução a pH 7,0 é sua forma zwitteriônica. Assuma um valor de pK_a de 8 para o grupo amino e um pK_a de 3 para o ácido carboxílico. Estime a razão entre a concentração dos aminoácidos neutros (com o ácido carboxílico protonado e o grupo amino neutro) e a forma zwitteriônica em pH 7,0 (ver a Seção 1.3).

27. Uma questão de convenção. Todos os aminoácidos L têm uma configuração absoluta *S,* à exceção da L-cisteína, que tem uma configuração *R*. Explique por que se considera que a L-cisteína tenha uma configuração absoluta *R*.

28. Mensagem oculta. Traduza a seguinte sequência de aminoácidos em seus códigos de uma letra: Glu-Leu-Val-Ile-Ser-Ile-Ser-Leu-Ile-Val-Ile-Asn-Gly-Ile-Asn-Leu-Ala-Ser-Val-Glu-Gly-Ala-Ser.

29. Quem vai primeiro? Você esperaria que ligações peptídicas Pro—X tendam a formar conformações cis como aquelas das X—Pro? Por quê?

30. Combinando. Para cada derivado de aminoácidos mostrados abaixo (A-E), encontre o conjunto de valores de ϕ e ψ (a-e).



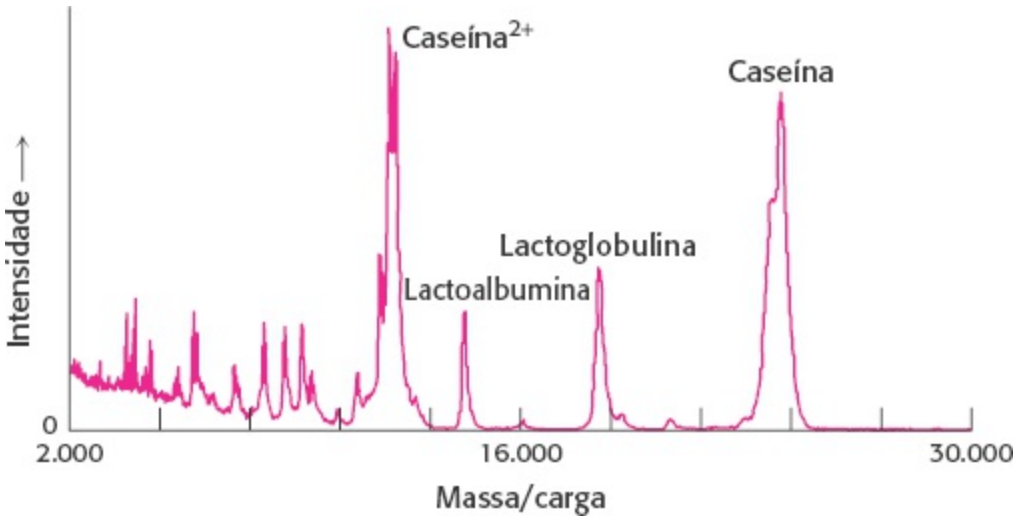
(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
$\phi = 120$, $\psi = 120$	$\phi = 180$, $\psi = 0$	$\phi = 180$, $\psi = 180$	$\phi = 0$, $\psi = 180$	$\phi = -60$, $\psi = -40$

31. Ribonuclease desnaturada. Enquanto realizava seus experimentos sobre o enovelamento de proteínas, Christian Anfinsen obteve resultados bem diferentes quando a ribonuclease reduzida era reoxidada enquanto estava em 8 M de ureia e só então a solução era dialisada para a remoção da

ureia. A ribonuclease reoxidada desta maneira tinha apenas 1% da atividade enzimática da proteína nativa. Por que resultados tão diferentes quanto a ribonuclease reduzida foi reoxidada na presença e na ausência de ureia?

Estudo das Proteínas e dos Proteomas

3



O leite, uma fonte nutricional para todos os mamíferos, é composto, em parte, por proteínas distintas. Os componentes proteicos do leite são revelados pela técnica de espectrometria de massa MALDI–TOF, que segrega as moléculas de acordo com suas razões de massa/carga. [(Esquerda) Okea/istockphoto.com. (Direita) Cortesia do Dr. Brian Chait.]

SUMÁRIO

3.1 A purificação de proteínas é um primeiro passo essencial para a compreensão de suas funções

3.2 As sequências de aminoácidos das proteínas podem ser determinadas experimentalmente

3.3 A imunologia fornece técnicas importantes para a investigação das proteínas

3.4 Aespectrometria de massa é uma poderosa técnica para a identificação dos peptídios e proteínas

3.5 Proteínas podem ser sintetizadas por métodos automatizados em fase sólida

3.6 Aestrutura tridimensional das proteínas pode ser determinada por cristalografia de raios X e espectroscopia de ressonância magnética

As proteínas têm papéis fundamentais em quase todos os processos biológicos – na catálise, na transmissão de sinais e no suporte estrutural. Esta formidável gama de funções é resultado da existência de milhares de proteínas, cada uma enovelada tridimensionalmente de maneira característica, o que as permite interagir com uma ou mais de uma grande e diversa quantidade de moléculas. Uma das principais metas da bioquímica é determinar como as sequências de aminoácidos especificam a conformação e, logo, a função das proteínas. Outras metas são aprender como as proteínas individuais se ligam a substratos específicos e a outras moléculas, como medeiam a catálise e transduzem energia e informação.

É geralmente preferível estudar uma proteína de interesse após a sua separação dos demais componentes da célula, de modo que a sua estrutura e função possa ser avaliada sem qualquer efeito de contaminantes. De fato, o primeiro passo nestes estudos é a purificação da proteína de interesse. As proteínas podem ser separadas umas das outras, de acordo com sua solubilidade, tamanho, carga e propriedades de ligação. Após a purificação da proteína, sua sequência de aminoácidos pode ser determinada. O sequenciamento automatizado de peptídios e a utilização de métodos de DNA recombinante têm enriquecido a literatura de sequências de aminoácidos e aberto novos panoramas. Muitas sequências de proteínas, geralmente deduzidas a partir das sequências de genomas, agora estão disponíveis em vastos bancos de dados. Se a sequência de uma proteína purificada foi arquivada em um banco de dados de busca pública, o trabalho do pesquisador se torna muito mais fácil. O pesquisador precisa apenas determinar um trecho da sequência de aminoácidos da proteína para encontrar seu correspondente no banco de dados. De maneira alternativa, tal proteína pode ser identificada por meio da comparação de sua massa com as massas deduzidas das proteínas presentes no banco de dados. A espectrometria de massa fornece um método poderoso para a determinação da massa de uma proteína.

Depois que uma proteína é purificada e sua identidade confirmada, o desafio de determinar sua função em um contexto fisiológico relevante permanece. Anticorpos são as "sondas" preferenciais para localizar as proteínas *in vivo* e medir suas quantidades. Anticorpos monoclonais, capazes de reconhecer proteínas específicas, podem ser obtidos em grandes quantidades e são utilizados para detectar e quantificar a proteína, tanto isoladamente quanto nas células. Os peptídios e as proteínas podem ser quimicamente sintetizados, fornecendo ferramentas para a pesquisa, e, em alguns casos, proteínas altamente purificadas são usadas como medicamentos. Finalmente, a cristalografia por raios X e a espectroscopia de ressonância magnética (RM) são as principais técnicas para a elucidação da estrutura tridimensional, um determinante-chave da função.

A pesquisa de proteínas por meio deste conjunto de técnicas físico-químicas enriqueceu muito nossa compreensão sobre as bases moleculares da vida. Estas técnicas tornam possível a abordagem de algumas das questões mais desafiadoras da biologia em termos moleculares.

O proteoma é a representação funcional do genoma

Como discutiremos no Capítulo 5, as sequências completas de bases do DNA – ou os *genomas* – de

muitos organismos estão agora disponíveis. Por exemplo, o nematódeo *Caenorhabditis elegans* tem um genoma de 97 milhões de bases e aproximadamente 19.000 genes codificadores de proteínas, enquanto o da mosca-das-fruta *Drosophila melanogaster* possui 180 milhões de bases e aproximadamente 14.000 genes. O genoma humano completamente sequenciado contém 3 bilhões de bases e aproximadamente 23.000 genes. No entanto, estes genomas são simples inventórios de genes que podem ser expressos em uma célula sob condições específicas. Apenas um subconjunto das proteínas codificadas por estes gentes estará presente de fato em um dado contexto biológico. O *proteoma* de um organismo – derivado das *proteí*nas expressas pelo gen*oma* – fornece informações mais complexas, abrangendo os tipos, funções e interações das proteínas em seus ambientes biológicos.

O proteoma não é uma característica fixa de uma célula. Como representa a expressão funcional da informação, ele varia de acordo com o tipo celular, estágio de desenvolvimento e condições ambientais, como a presença de hormônios. O proteoma é muito maior que o genoma porque quase todos os produtos gênicos são proteínas que podem ser quimicamente modificadas de várias formas diferentes. Além disso, essas proteínas não existem isoladamente; elas geralmente interagem umas com as outras para formar complexos com propriedades funcionais específicas. Enquanto o genoma é estático, o proteoma é altamente dinâmico. É possível compreender o proteoma por meio da investigação, caracterização e catalogação das proteínas. Em alguns casos este processo começa com a separação de uma proteína em particular de todas as outras biomoléculas da célula.

3.1 A purificação de proteínas é um primeiro passo essencial para a compreensão de suas funções

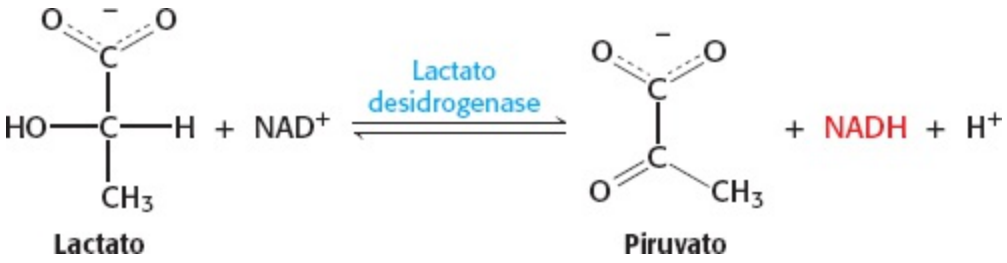
Há um provérbio da bioquímica que diz: "Nunca desperdice pensamentos puros em uma proteína impura". Começando com proteínas purificadas, podemos determinar as sequências de aminoácidos e investigar a função bioquímica da proteína. A partir das sequências de aminoácidos, podemos mapear as relações evolutivas entre as proteínas em diversos organismos (Capítulo 6). Por meio de cristais de pura proteína, podemos obter os dados de raios X que nos fornecerá uma imagem da estrutura terciária da proteína – a forma que determina a função.

Ensaio | Como reconhecemos a proteína que estamos procurando?

A purificação deve resultar em uma amostra contendo apenas um tipo de molécula – a proteína na qual o bioquímico está interessado. Esta amostra proteica pode ser apenas uma fração de 1% do material inicial, dependendo se o material inicial é composto por um tipo celular em cultura ou um órgão em particular de uma planta ou animal. Como um bioquímico é capaz de isolar uma proteína em particular de uma mistura complexa de proteínas?

Uma proteína pode ser purificada submetendo-se uma mistura impura do material inicial a uma série de separações baseadas nas propriedades físicas da proteína, como tamanho e carga. Para monitorar o sucesso desta purificação, o bioquímico precisa de um teste, chamado de *ensaio*, para alguma propriedade característica única que identifique a proteína. Um resultado positivo no ensaio indica que a proteína está presente. Embora o desenvolvimento do ensaio seja uma tarefa desafiadora, quanto mais específico o ensaio, mais efetiva a purificação. Para enzimas, que são

catalisadores proteicos (Capítulo 8), o ensaio frequentemente mede a *atividade enzimática* – ou seja, a capacidade da enzima em promover uma reação química em particular. Esta atividade é geralmente medida indiretamente. Considere a enzima lactato desidrogenase, que catalisa a seguinte reação na síntese de glicose:



Lactato Piruvato

A nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida (NADH, ver Figura 15.13) absorve luz a 340 nm, enquanto a nicotinamida adenina dinucleotídio oxidada (NAD^+) não o faz. Consequentemente, podemos acompanhar o progresso da reação por meio da observação da capacidade absortiva de luz que a amostra desenvolve em um dado período de tempo – por exemplo, 1 min após a adição da enzima. Nosso ensaio de atividade enzimática durante a purificação da lactato desidrogenase consiste então no aumento da absorbância da luz a 340 nm observada em 1 min.

Para analisar como nosso esquema de purificação está funcionando, precisamos de uma informação adicional – a quantidade de proteína presente na mistura do ensaio. Há vários meios rápidos e razoavelmente acurados para determinar a concentração de proteínas. Com estes dois dados experimentais – atividade enzimática e concentração proteica – podemos então calcular a *atividade específica* – a razão da atividade enzimática e a quantidade de proteína na mistura. Idealmente, a atividade específica aumenta à medida que a purificação continua, e a mistura de proteínas do ensaio é cada vez mais constituída pela lactato desidrogenase. Essencialmente, o objetivo geral da purificação é maximizar a atividade específica. Para uma enzima pura, a atividade enzimática específica terá um valor constante.

As proteínas têm de ser liberadas da célula para serem purificadas

Tendo encontrado um ensaio e uma fonte de proteína, agora fracionaremos a célula em componentes e determinaremos quais componentes tem um enriquecimento da proteína de interesse. Em um primeiro passo, um *homogenato* é formado por meio da ruptura da membrana celular e a mistura é fracionada por centrifugação, resultando em um precipitado denso de material pesado no fundo do tubo da centrífuga e um sobrenadante leve acima (Figura 3.1). O sobrenadante é centrifugado novamente com maior velocidade para gerar outro precipitado e sobrenadante. O procedimento, chamado de *centrifugação diferencial*, gera diversas frações com densidades decrescentes, cada uma contendo ainda centenas de proteínas diferentes. As frações são ensaiadas separadamente, quanto à presença da atividade desejada. Geralmente uma fração será mais rica em determinada atividade e serve de fonte de material para a aplicação subsequente de técnicas de purificação mais apuradas.

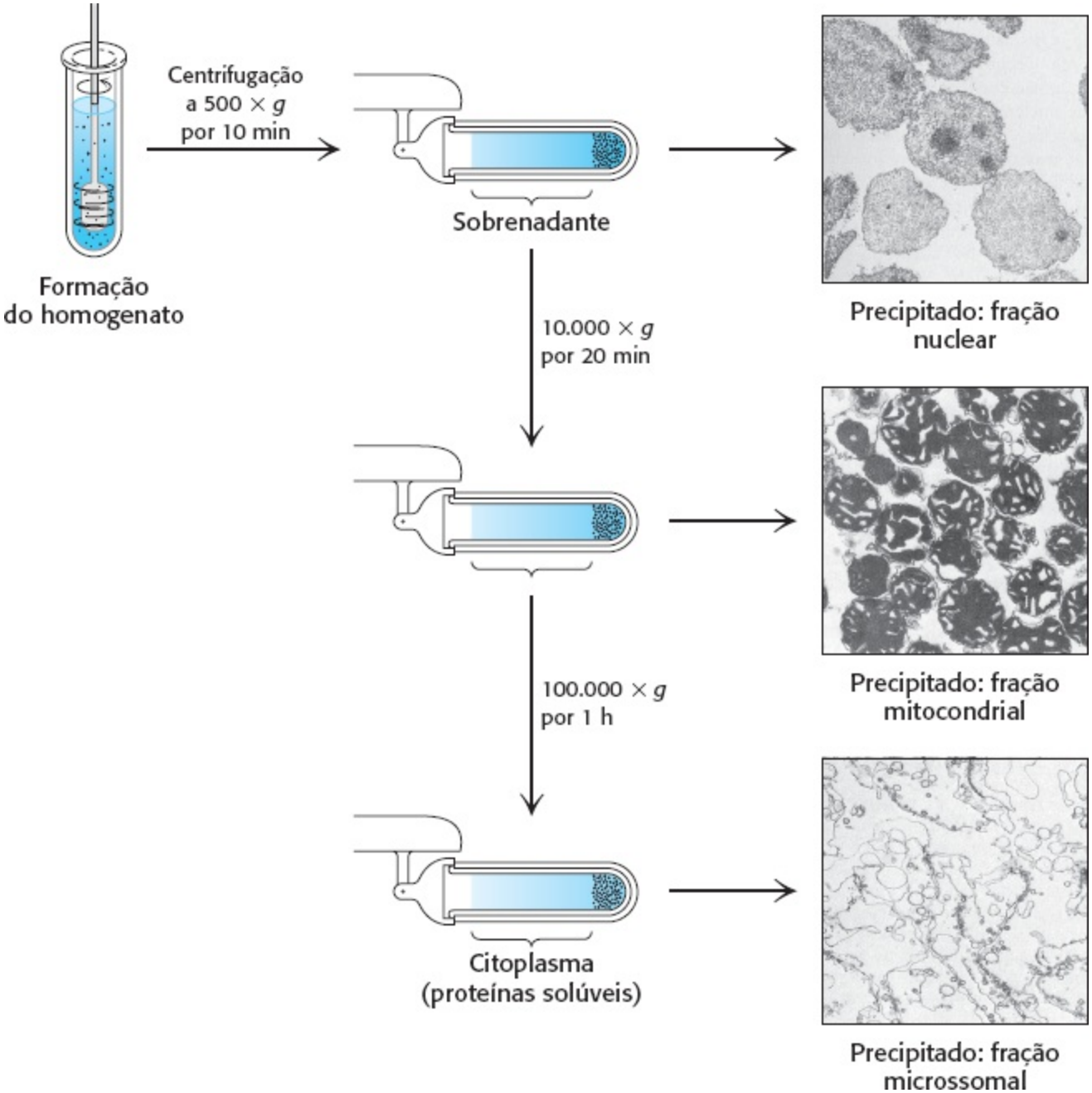


Figura 3.1 Centrifugação diferencial. As células são rompidas em um homogeneizador, e a mistura resultante, chamada de homogenato, é centrifugada em um procedimento passo a passo de força centrífuga crescente. O material mais denso formará um precipitado em forças centrífugas menores do que os materiais menos densos. As frações isoladas podem ser utilizadas para purificações posteriores. [Fotografias de cortesia do Dr. S. Fleischer e Dr. B. Fleischer.]

As proteínas podem ser purificadas de acordo com a solubilidade, tamanho, carga e afinidade de ligação

Milhares de proteínas foram purificadas nas formas ativas de acordo com características como *solubilidade, tamanho, carga* e *afinidade de ligação específica.* Geralmente as misturas de proteínas são submetidas a uma série de separações, cada uma baseada em uma propriedade diferente. Em cada etapa da purificação, a preparação é ensaiada e sua atividade específica, determinada. Uma variedade de técnicas de purificação está disponível.

Precipitação (*salting out*). A maioria das proteínas são menos solúveis em altas concentrações de sal, um efeito conhecido como *salting out.* A concentração de sal na qual uma proteína precipita difere de uma proteína para a outra, de modo que esta técnica pode ser utilizada para fracioná-las.

Por exemplo, 0,8 M de sulfato de amônio precipita o fibrinogênio, uma proteína da coagulação sanguínea, enquanto uma concentração de 2,4 M é necessária para precipitar a albumina sérica. A precipitação pode ser útil também para concentrar soluções diluídas de proteínas, incluindo frações ativas obtidas em outras etapas de purificação. A diálise pode ser usada para remover o sal, se necessário.

Diálise. As proteínas podem ser separadas de moléculas pequenas como o sal por meio de *diálise* através de uma membrana semipermeável, como uma membrana de celulose com poros (Figura 3.2). A mistura de proteínas é colocada dentro de um saco de diálise, que é então submerso em uma solução tampão desprovida das moléculas pequenas que se deseja separar. As moléculas com tamanho significativamente maior que o diâmetro do poro serão retidas dentro do saco de diálise, enquanto as moléculas menores e íons capazes de passar pelo poro da membrana se difundirão de acordo com seus gradientes de concentração para fora do saco. Esta técnica é útil para a remoção de um sal ou outras pequenas moléculas de um fracionado celular, mas não fará distinção entre as proteínas efetivamente.

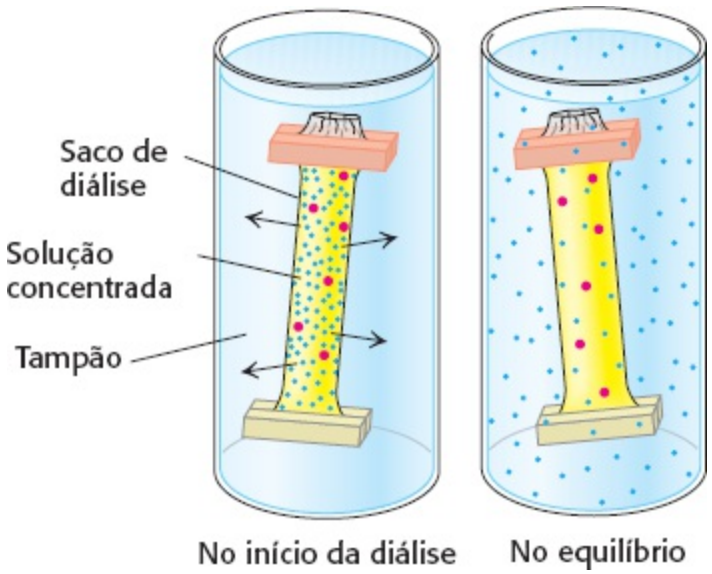


Figura 3.2 Diálise. As moléculas de proteína (vermelhas) são retidas dentro do saco de diálise, enquanto as pequenas moléculas (azuis) se difundem de acordo com seus gradientes de concentração para o meio ao redor.

Cromatografia de filtração em gel. Separações com maior discriminação, com base no tamanho das proteínas, podem ser obtidas por meio da técnica de *cromatografia de filtração em gel*, também conhecida como cromatografia de exclusão molecular (Figura 3.3). A amostra é aplicada no topo de uma coluna constituída de grãos porosos de polímeros insolúveis, porém altamente hidratados, como dextrana e agarose (ambos carboidratos) ou poliacrilamida. Sephadex®, Sepharose® e Biogel® são as preparações comerciais mais usadas destes grãos, que têm tipicamente 100 μm (0,1 mm) de diâmetro. Moléculas pequenas podem entrar nestes grãos, mas as maiores não. O resultado é que as moléculas pequenas são distribuídas na solução aquosa tanto dentro destes grãos quanto entre eles, enquanto as moléculas maiores se localizam apenas na solução entre os grãos. *As moléculas maiores fluem mais rapidamente por esta coluna e emergem antes, porque um volume menor está acessível a elas.* As moléculas que têm tamanho para ocasionalmente entrar nos grãos fluirão pela coluna em uma posição intermediária, e as pequenas moléculas, que levam mais tempo e um caminho tortuoso,

sairão por último.

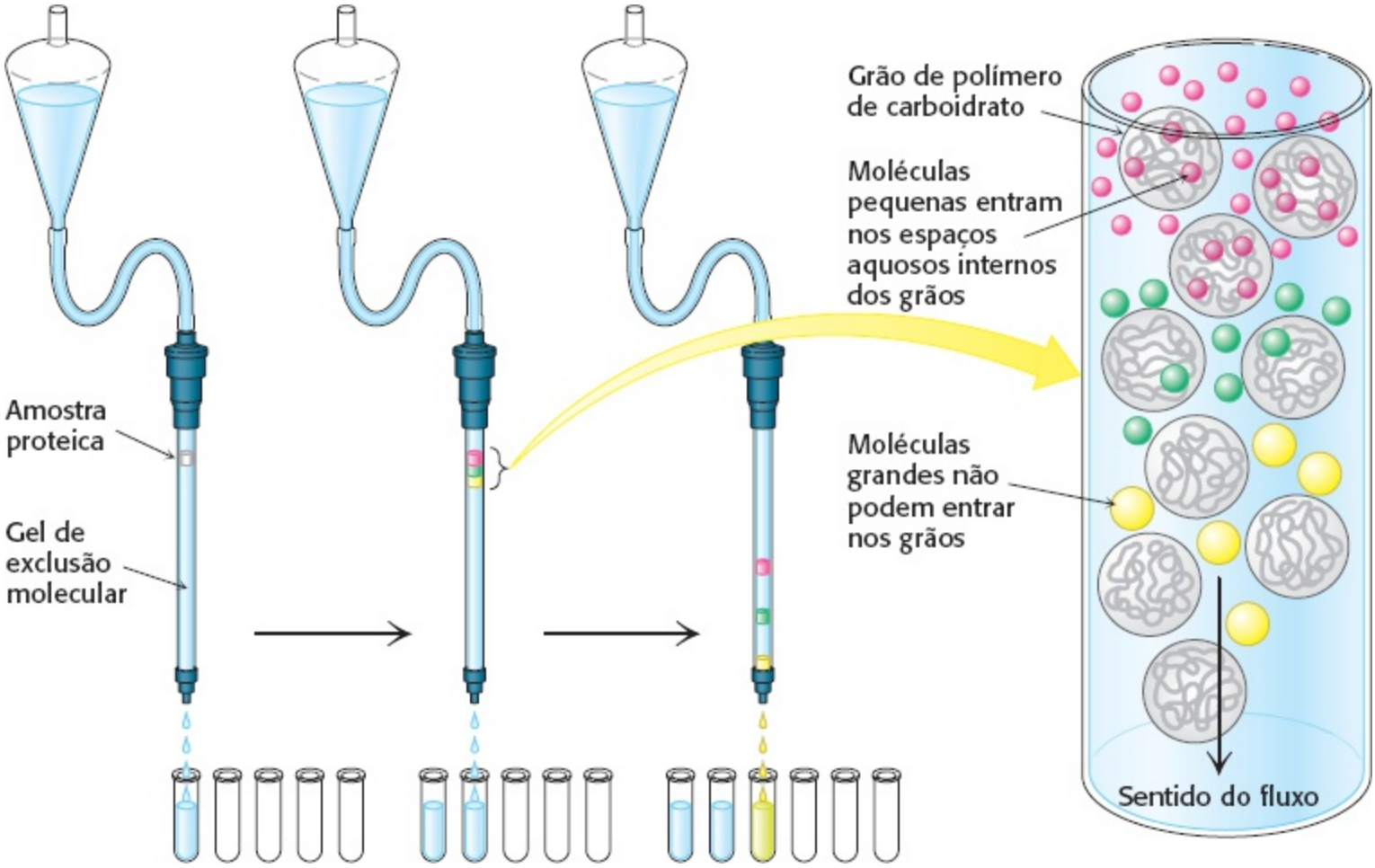


Figura 3.3 Cromatografia de filtração em gel. Uma mistura de proteínas em um pequeno volume é aplicada a uma coluna preenchida com grãos porosos. Como proteínas grandes não podem ter acesso ao volume interno dos grãos, elas emergem antes que as pequenas.

Cromatografia de troca iônica. Para obter uma proteína de alta pureza, uma etapa de cromatografia geralmente não é suficiente, porque outras proteínas presentes na mistura provavelmente irão coeluir com o material desejado. Um maior nível de pureza pode ser alcançado por meio da execução de separações sequenciais baseadas em propriedades moleculares diferentes. Por exemplo, além do tamanho, as proteínas podem ser separadas com base em sua carga total por *cromatografia de troca iônica*. Se uma proteína tem uma carga total positiva em pH 7, ela geralmente se liga a uma coluna de grãos contento grupos carboxilato, enquanto uma proteína com carga negativa não o faz (Figura 3.4). A proteína ligada pode então ser eluída (liberada) pelo aumento da concentração de cloreto de sódio ou outro sal no tampão de eluição; os íons de sódio competem com os grupos com carga positiva na proteína pela ligação à coluna. As proteínas que têm uma baixa densidade de cargas positivas tendem a sair primeiro, seguidas por aquelas com densidade de cargas maior. Este procedimento também é conhecido como *troca de cátions*, para indicar que grupos com cargas positivas se ligarão aos grãos aniônicos. As proteínas com cargas positivas (proteínas catiônicas) podem ser separadas por cromatografia através de colunas com cargas negativas de carboximetilcelulose (CM-celulose). Por outro lado, as proteínas com cargas negativas (proteínas aniônicas) podem ser separadas por *troca de ânions* em colunas com cargas positivas de dietilaminoetilcelulose (DEAE-celulose).

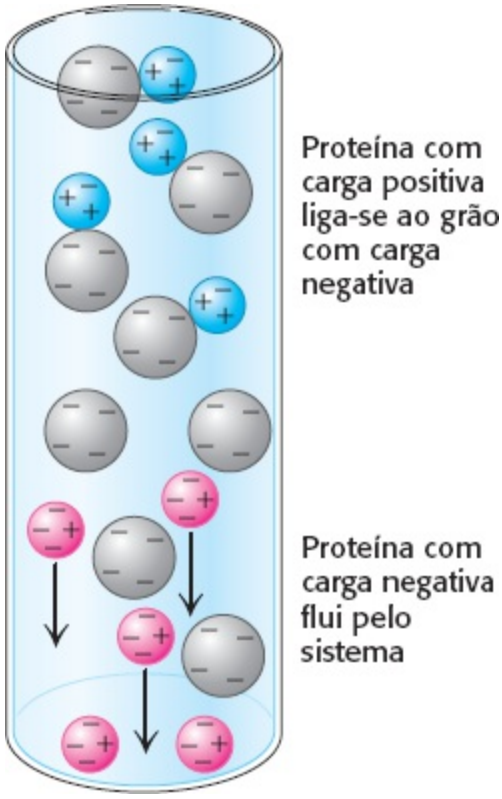
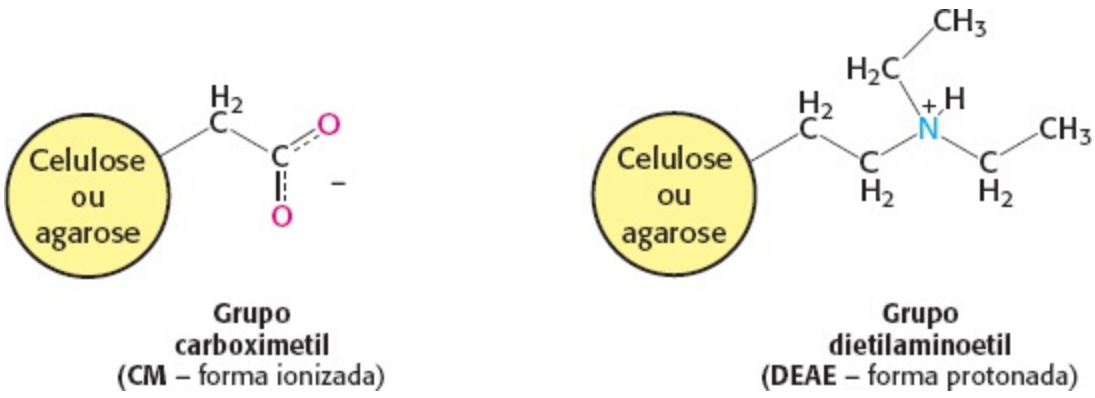


Figura 3.4 Cromatografia de troca iônica. Esta técnica separa as proteínas principalmente por sua carga total.



Cromatografia de afinidade. A *cromatografia de afinidade* é outro processo poderoso de purificação de proteínas que é altamente seletivo para a proteína de interesse. Esta técnica se aproveita da alta afinidade que muitas proteínas exibem a grupos químicos específicos. Por exemplo, a proteína (ou lecitina – Seção 11.4) vegetal concanavalina A é uma proteína ligante de carboidratos que tem afinidade para a glicose. Quando um extrato bruto de proteínas passa por uma coluna com grãos contendo resíduos de carboidratos covalentemente ligados, a concanavalina A liga-se a estes grãos, enquanto a maior parte das outras proteínas não o faz (Figura 3.5). A concanavalina A ligada pode ser então liberada da coluna por meio da adição de uma solução concentrada de glicose. A solução de glicose desloca os resíduos de glicose aderidos à coluna dos sítios de ligação da concanavalina A. A cromatografia de afinidade é um método poderoso de isolamento de fatores de transcrição – proteínas que regulam a expressão gênica ao se ligarem a sequências específicas do DNA. Uma mistura de proteínas é percolada por uma coluna contendo sequências específicas de DNA ligadas à matriz; as proteínas com alta afinidade pela sequência se ligarão e serão retidas. Neste caso, o fator de transcrição é liberado lavando-se a coluna com uma solução com alta concentração de sal.

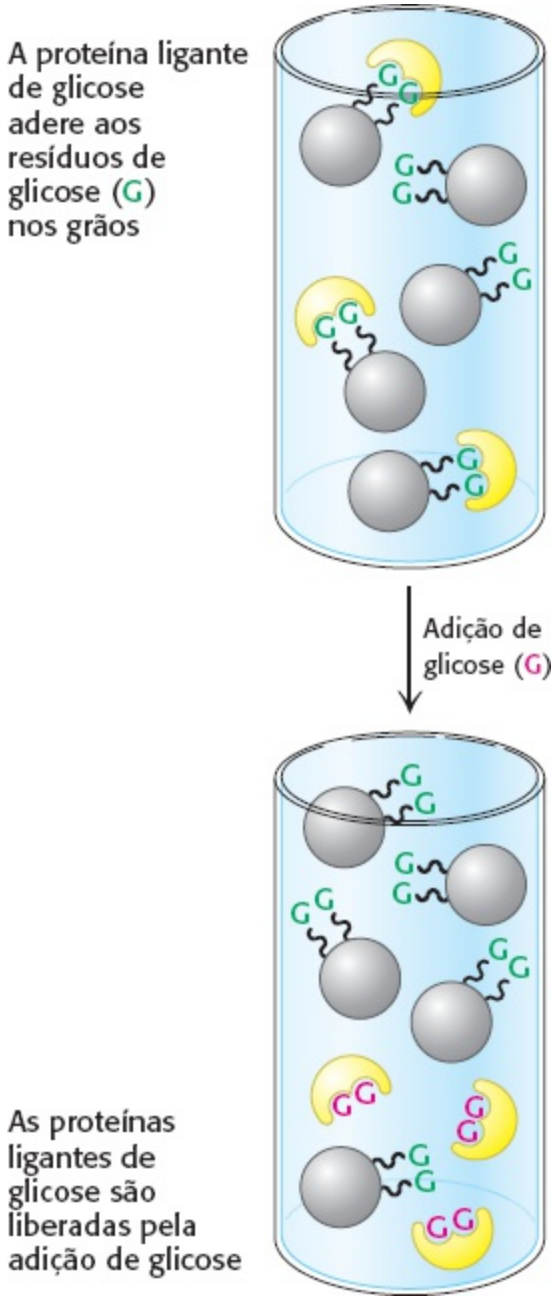


Figura 3.5 Cromatografia de afinidade. A cromatografia de afinidade da concanavalina A (mostrada em amarelo) em um suporte sólido contendo resíduos de glicose (G) covalentemente ligados.

Em geral, a cromatografia de afinidade pode ser efetivamente usada para isolar uma proteína que reconhece um grupo X das seguintes formas: 1) ligando covalentemente X ou seu derivado a uma coluna; 2) adicionando uma mistura de proteínas a esta coluna, que será então lavada com tampão para remover as proteínas não ligadas; e 3) eluindo a proteína desejada por meio da adição de uma alta concentração de X em forma solúvel, ou alterando as condições de forma a diminuir a afinidade de ligação com a coluna. A cromatografia de afinidade é mais efetiva quando a interação da proteína e a molécula usada como "isca" é altamente específica.

O processo da cromatografia de afinidade padrão pode isolar proteínas expressas a partir de genes clonados (Seção 5.2). Aminoácidos extras são codificados no gene clonado de forma que, quando expressos, servem como um marcador (ou etiqueta) de afinidade que pode ser facilmente isolado. Por exemplo, repetições do códon de histidina podem ser adicionadas de forma que a proteína expressa tenha uma sequência de resíduos de histidina (chamada de *etiqueta His*) em uma extremidade. As proteínas marcadas são então percoladas em uma coluna de grãos contendo níquel

(II), ou outros íons metálicos covalentemente ligados. A etiqueta de His liga-se fortemente aos íons imobilizados, ligando a proteína desejada, enquanto outras proteínas fluem pela coluna. A proteína pode ser então eluída da coluna pela adição de imidazol ou outro composto químico que se ligue aos íons metálicos e desloque a proteína.

Cromatografia líquida de alta pressão. Uma técnica chamada de *cromatografia líquida de alta pressão* (HPLC, do inglês *high-pressure liquid chromatography*) é uma versão melhorada das técnicas de colunas mencionadas anteriormente. Os materiais das colunas são muito mais bem divididos e, como consequência, possuem mais sítios de interação e assim têm mais poder de resolução. Como a coluna é feita de um material mais fino, deve-se aplicar pressão à coluna para obter taxas de fluxo adequadas. O resultado final é tanto uma melhor resolução quanto uma rápida separação. Em uma montagem típica de HPLC, um detector que monitora a absorbância do material eluído em um comprimento de onda em particular é colocado imediatamente após a coluna. No perfil de eluição da amostra de HPLC mostrado na Figura 3.6, as proteínas são detectadas ajustando o detector a 220 nm (o comprimento de onda característico de absorbância da ligação peptídica). Em um curto intervalo de 10 min, um número de picos agudos representantes das proteínas individuais pode ser prontamente identificado.

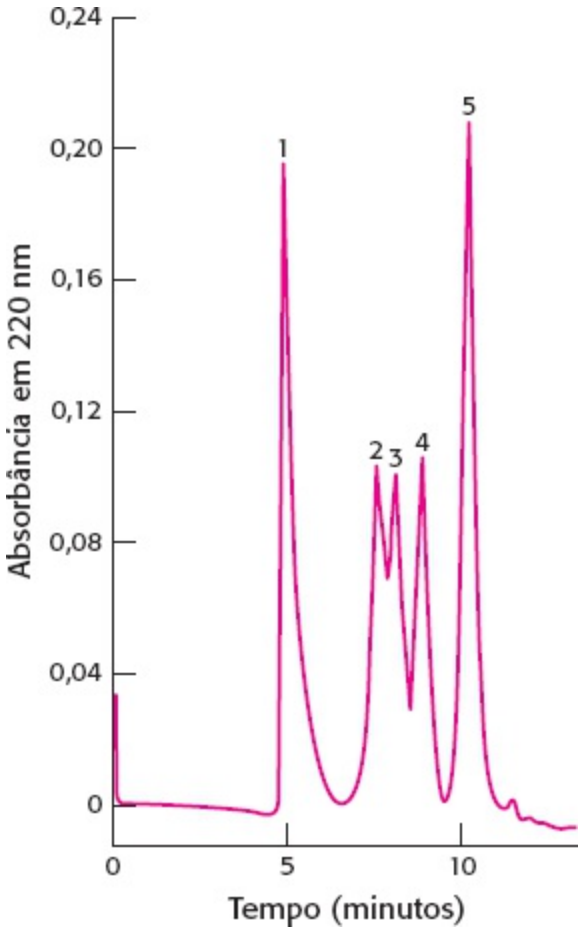


Figura 3.6 Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). A filtração em gel pelo HPLC claramente define proteínas individuais porque tem maior poder de resolução: (1) tireoglobulina (669 kDa), (2) catalase (232 kDa), (3) albumina sérica bovina (67 kDa), (4) ovoalbumina (43 kDa), e (5) ribonuclease (13,4 kDa). [Segundo K. J. Wilson e T. D. Schlabach. Em *Current Protocols in Molecular Biology,* vol. 2, supl. 41, F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, e K. Struhl, Eds. (Wiley, 1998) p.10.14.1.]

As proteínas podem ser separadas por eletroforese em gel e reveladas

Como podemos dizer se um esquema de purificação é eficiente? Uma maneira é assegurar que a atividade específica aumenta a cada etapa da purificação. Outro é determinar que o número de proteínas diferentes em cada amostra diminua em cada etapa de purificação. A técnica de eletroforese torna a última metodologia possível.

Eletroforese em gel. Uma molécula com uma carga elétrica se moverá em um campo elétrico. Este fenômeno, chamado de eletroforese, oferece um poderoso meio de separação de proteínas e outras macromoléculas, como o DNA e o RNA. A velocidade de migração (v) de uma proteína (ou qualquer molécula) em um campo elétrico depende da força do campo (E), a carga total da proteína (z) e o coeficiente friccional (f).

$$v = Ez/f \qquad (1)$$

A força elétrica Ez que dirige a molécula carregada na direção do polo de carga oposta sofre oposição pelo arrasto viscoso fv dado pela fricção entre a molécula em movimento e o meio. O coeficiente friccional f depende tanto da massa e da forma da molécula em movimento quanto da viscosidade (η) do meio. Para uma esfera de raio r,

$$f = 6\pi\eta r \qquad (2)$$

As separações eletroforéticas são quase sempre executadas em géis porosos (ou em suportes sólidos como papel) porque o gel funciona como uma peneira molecular que melhora a separação (Figura 3.7). As moléculas que são pequenas comparadas aos poros do gel rapidamente se movem por ele, enquanto as moléculas muito maiores que os poros são praticamente imóveis. As moléculas de tamanho intermediário podem se mover pelo gel com níveis variados de facilidade. O campo elétrico é aplicado de forma que as proteínas migram do eletrodo negativo para o positivo, tipicamente do topo para a base. A eletroforese é executada em uma lâmina fina de gel de poliacrilamida. Tais géis são o meio de escolha para a eletroforese porque são quimicamente inertes e são rapidamente formados pela polimerização da acrilamida com uma pequena quantidade do agente de ligação cruzada metileno-bis-acrilamida, para a formação de uma rede tridimensional (Figura 3.8). A eletroforese difere da filtração em gel porque, em razão do campo elétrico, todas as moléculas, independente do tamanho, são forçadas a se movimentarem através da mesma matriz.

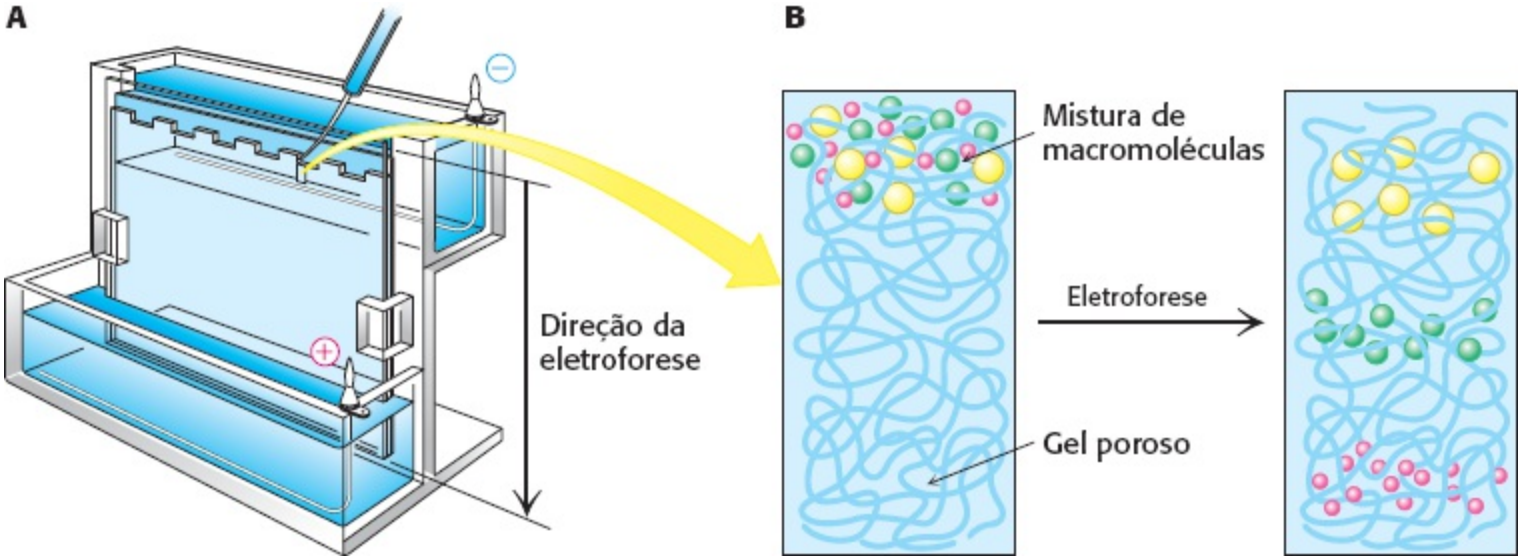


Figura 3.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida. **A.** O aparato da eletroforese em gel. Tipicamente, diversas amostras são submetidas à eletroforese em um gel de poliacrilamida. Uma micropipeta é utilizada para colocar as soluções de proteínas nos pequenos "poços" da lâmina. Uma tampa é então disposta em cima da câmara do gel e a voltagem é aplicada. O complexo SDS (dodecil sulfato de sódio)–proteínas, negativamente carregado, migra na direção do anodo, na base do gel. **B.** A ação filtradora do gel poroso de poliacrilamida separa as proteínas de acordo com o tamanho, com as menores se movendo mais rapidamente.

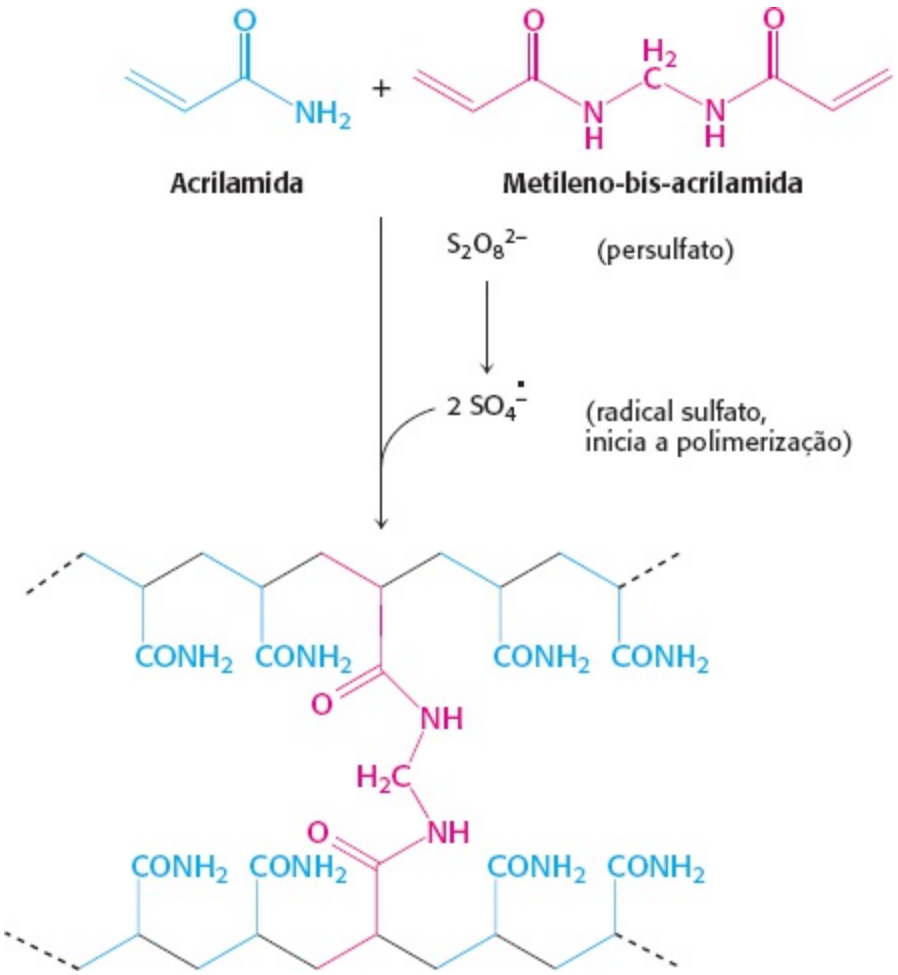


Figura 3.8 Formação do gel de poliacrilamida. Uma rede tridimensional é formada por meio da copolimerização do monômero ativado (azul) e do agente de ligação cruzada (vermelho).

Dodecil sulfato de sódio (SDS)

As proteínas podem ser separadas principalmente de acordo com sua massa em uma eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes. A mistura de proteínas é inicialmente dissolvida em solução com o dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente aniônico que quebra praticamente todas as interações não covalentes das proteínas nativas. O β-mercaptoetano (2-tioetanol) ou ditiotreitol é adicionado para reduzir as pontes dissulfeto. Os ânions do SDS ligam-se às cadeias principais em uma razão de um ânion-SDS para cada dois resíduos de aminoácidos. A carga negativa adquirida na ligação com o SDS é geralmente muito maior que a carga na proteína original; a contribuição da proteína para a carga total do complexo SDS-proteína é, então, considerada insignificante. Como resultado, este complexo do SDS com a proteína desnaturada tem uma grande carga negativa global, que é grosseiramente proporcional à massa da proteína. Os complexos SDS-proteína são então submetidos à eletroforese. Quando esta é completa, as proteínas no gel podem ser visualizadas por meio da coloração com prata ou corantes como o azul de Coomassie, que revela uma série de bandas (Figura 3.9). Marcações radioativas, se foram incorporadas às proteínas, podem ser detectadas colocando-se uma película de raios X sobre o gel, um procedimento conhecido como *autorradiografia.*

Pequenas proteínas movem-se rapidamente pelo gel, enquanto as proteínas maiores permanecem no topo, próximo ao ponto da aplicação da mistura. A mobilidade da maioria das cadeias polipeptídicas nestas condições é praticamente proporcional ao logaritmo de sua massa (Figura 3.10). Algumas proteínas ricas em carboidratos e proteínas de membrana não obedecem a esta relação empírica, no entanto. A eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (geralmente referida como SDS-PAGE) é rápida, sensível e capaz de um alto grau de resolução. Mesmo apenas 0,1 μg (~2 pmol) de uma proteína fornece uma banda distinguível quando corado com azul de Coomassie, ou menos (~0,02 μg) pode ser detectado com coloração por prata. As proteínas que têm massa diferente

em aproximadamente 2% (p.ex., 50 e 51 kDa, diferença dada por cerca de 10 resíduos de aminoácidos) podem normalmente ser distinguidas com um SDS-PAGE.

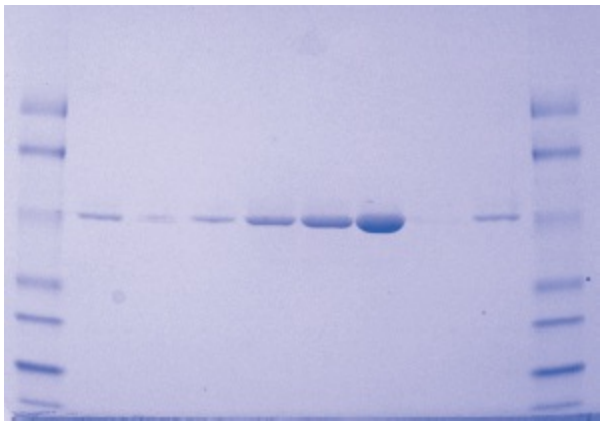


Figura 3.9 Coloração das proteínas após a eletroforese. As proteínas submetidas à eletroforese em um gel de SDS-poliacrilamida podem ser visualizadas por meio da coloração com azul de Coomassie. [Cortesia da Kodak Scientific Imaging Systems.]

Podemos examinar a eficácia de nosso esquema de purificação analisando uma parte de cada fração por eletroforese. As frações iniciais mostrarão dúzias a centenas de proteínas. À medida que a purificação progride, o número de bandas diminui e a proeminência de uma das bandas deve aumentar. Esta banda deve corresponder à proteína de interesse.

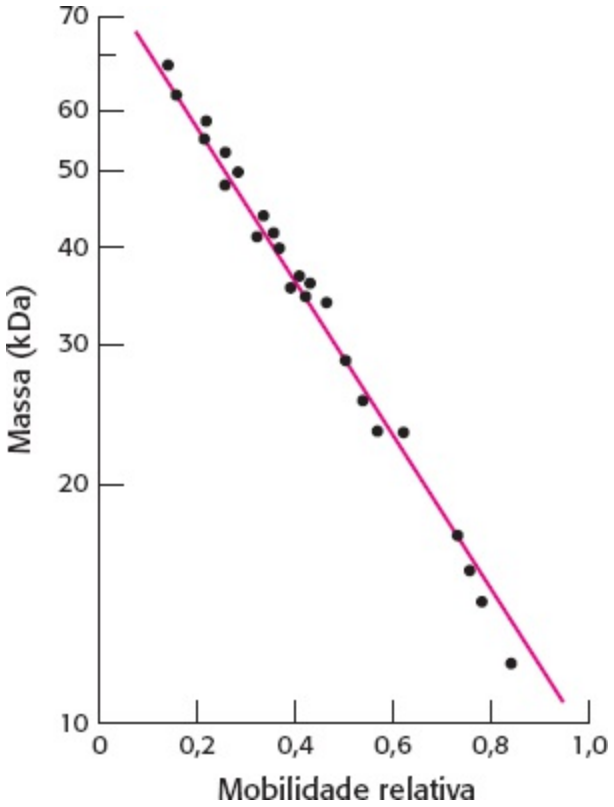


Figura 3.10 eletroforese pode determinar a massa. A mobilidade eletroforética de muitas proteínas em um gel de SDS-poliacrilamida é inversamente proporcional ao logaritmo de suas massas. [Segundo K. Weber e M. Osborn, *The Proteins*, vol.1, 3rd ed. (Academic Press, 1975), p.179.]

Focalização isoelétrica. As proteínas também podem ser separadas eletroforeticamente de acordo com seus conteúdos relativos de resíduos ácidos ou básicos. O *ponto isoelétrico* (pI) de uma

proteína é o pH no qual sua carga total é zero. Neste pH, sua mobilidade eletroforética é zero, porque *z* na equação 1 é igual a zero. Por exemplo, o pI do citocromo *c*, uma proteína de transporte de elétrons altamente básica, é 10,6, enquanto o pI da albumina sérica, uma proteína ácida do sangue, é 4,8. Suponha que uma mistura de proteína seja submetida a eletroforese em um gradiente de pH na ausência de SDS. Cada proteína se moverá até que atinja uma posição no gel na qual o pH é igual ao pI da proteína. Este método de separação de proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos é chamado de *focalização isoelétrica*. O gradiente de pH no gel é formado inicialmente pela eletroforese de uma mistura de *polianfólitos* (pequenos polímeros com múltiplas cargas), que têm muitos valores diferentes de pI. A focalização isoelétrica pode rapidamente separar proteínas que tem pI diferente em apenas 0,01, o que significa que proteínas que diferem em apenas uma carga podem ser separadas (Figura 3.11).

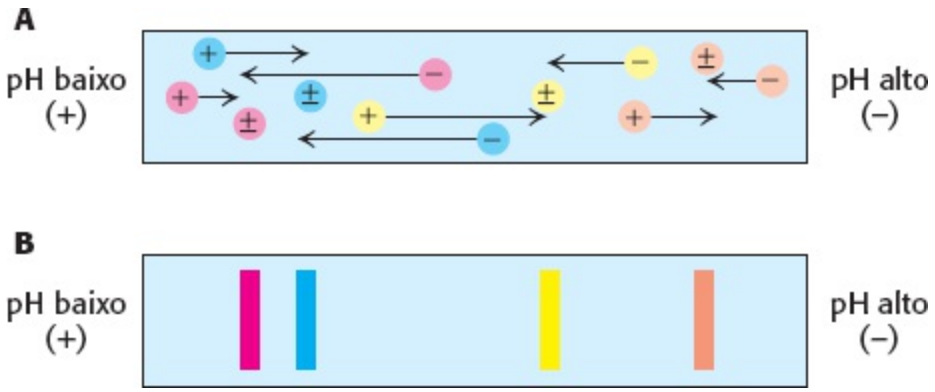


Figura 3.11 Princípio da focalização isoelétrica. Um gradiente de pH é estabelecido em um gel antes da utilização da amostra. **A.** A amostra é colocada e a voltagem, aplicada. As proteínas migram para seu pH isoelétrico, o local onde elas não têm carga elétrica líquida. **B.** As proteínas formam bandas que podem ser retiradas e usadas para experimentos adicionais.

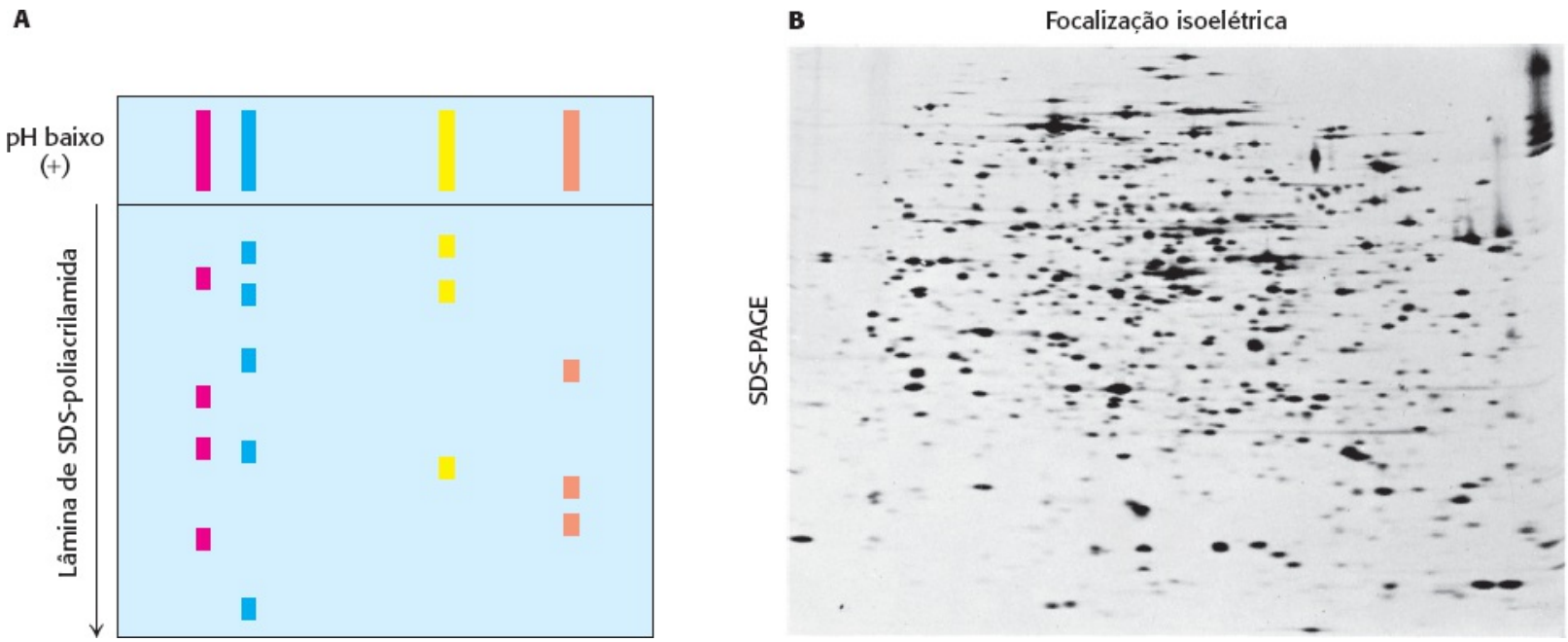


Figura 3.12 Eletroforese bidimensional em gel. **A.** Uma amostra de proteína é fracionada em uma dimensão pela focalização isoelétrica, como descrito na Figura 3.11. O gel da focalização isoelétrica é então acoplado ao gel de SDS-poliacrilamida e a eletroforese é executada na segunda dimensão, perpendicular à separação original. As proteína com o mesmo pI são agora separadas com base em sua massa. **B.** As proteínas da *E. coli* foram separadas por eletroforese de gel bidimensional, isolando mais de mil proteínas diferentes. As proteínas foram inicialmente separadas de acordo com seu pH isoelétrico na direção horizontal e então por sua massa aparente na direção vertical. [(B) Cortesia do Dr. Patrick H.

O'Farrell.]

Eletroforese bidimensional. A focalização isoelétrica pode ser combinada com o SDS-PAGE para obter separações com altíssimas resoluções. Uma amostra única é inicialmente submetida à focalização isoelétrica. Este gel, com uma raia única, é então disposto horizontalmente acima de uma coluna de uma lâmina de SDS-poliacrilamida. As proteínas são então dispostas ao longo do topo do gel de poliacrilamida de acordo com o quanto migraram durante a focalização isoelétrica. Elas então são submetidas à eletroforese de novo, em uma direção perpendicular (verticalmente) para dar origem a um padrão bidimensional de pontos. Em um gel como este, as proteínas foram separadas no sentido horizontal de acordo com seu ponto isoelétrico e no sentido vertical de acordo com sua massa. Notavelmente, mais de mil proteínas diferentes da bactéria *Escherichia coli* podem ser separadas em um único experimento de eletroforese bidimensional (Figura 3.12).

As proteínas isoladas de células em diferentes contextos fisiológicos podem ser submetidas à eletroforese bidimensional. As intensidades dos pontos individuais do gel podem então ser comparadas, o que indica que a concentração de proteínas específicas mudou em resposta ao estado fisiológico (Figura 3.13). Como podemos descobrir a identidade da proteína que exibe tal comportamento? Embora muitas proteínas sejam exibidas em um gel bidimensional, elas não foram identificadas. Agora é possível identificar as proteínas conjugando a eletroforese em gel bidimensional com as técnicas de espectrometria de massa. Examinaremos estas poderosas técnicas em breve (Seção 3.4).

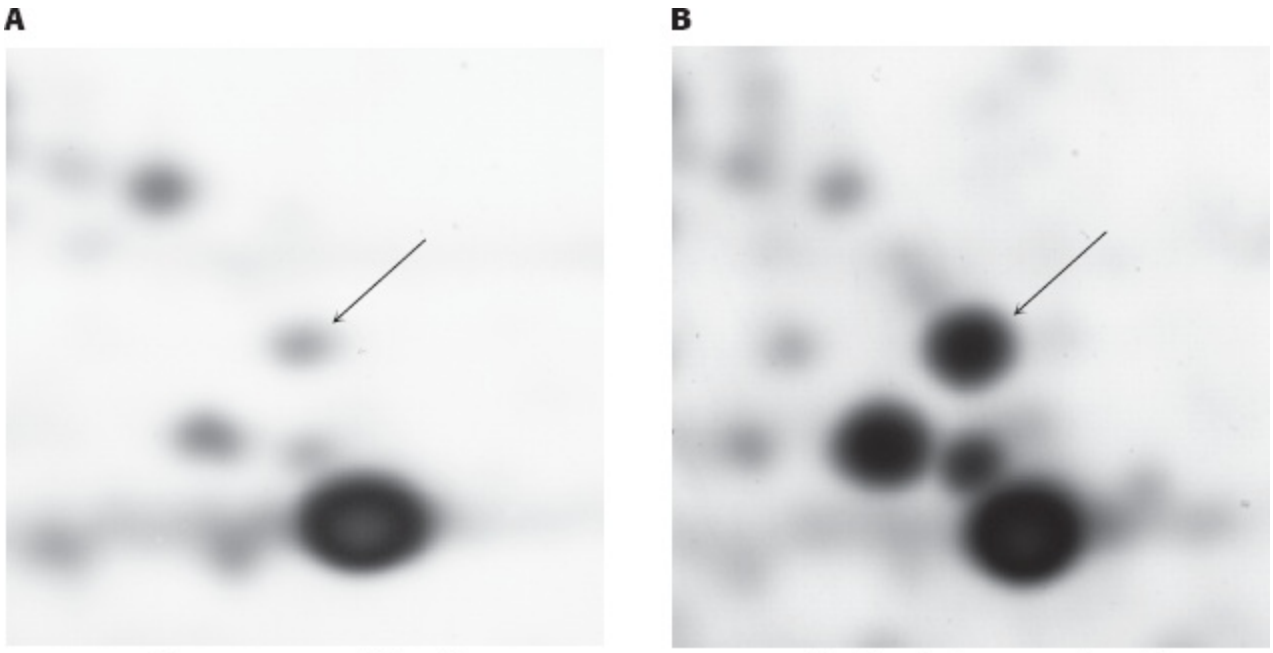


Figura 3.13 Alterações nos níveis de proteína detectadas pela eletroforese bidimensional em gel. Amostras de tecido da mucosa do cólon normal e de um tumor colorretal de uma mesma pessoa foram analisadas por meio de uma eletroforese bidimensional em gel. Na seção do gel exibida, as mudanças na intensidade de vários pontos são evidentes, incluindo um dramático aumento nos níveis da proteína indicada pela seta, correspondendo à enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase. [Cortesia de Lin Quinsong © 2010, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.]

Tabela 3.1 Quantificação de um protocolo de purificação de uma proteína fictícia.

Etapa	Proteína total (mg)	Atividade total (unidades)	Atividade específica (unidade mg^{-1})	Rendimento (%)	Grau de purificação

Homogeneização	15.000	150.000	10	100	1
Fracionamento salino	4.600	138.000	30	92	3
Cromatografia de troca iônica	1.278	115.500	90	77	9
Cromatografia de filtração em gel	68,8	75.000	1.100	50	110
Cromatografia de afinidade	1,75	52.500	30.000	35	3.000

Um esquema de purificação de proteínas pode ser quantitativamente avaliado

Para determinar o sucesso de um esquema de purificação de proteína, monitoramos cada etapa do procedimento determinando a atividade específica da mistura proteica e submetendo-a a uma análise por SDS-PAGE. Considere os resultados para a purificação de uma proteína fictícia, resumidos na Tabela 3.1 e na Figura 3.14. Em cada etapa os seguintes parâmetros são medidos:

Proteína total. A quantidade de proteína presente em uma fração é obtida determinando-se a concentração de uma parte de cada fração, multiplicada pelo volume total da fração.

Atividade total. A atividade enzimática da fração é obtida medindo-se a atividade da enzima no volume da fração utilizada no ensaio, multiplicado pelo volume total da fração.

Atividade específica. Este parâmetro é obtido dividindo-se a atividade total pela proteína total.

Rendimento. Este parâmetro é a medida da atividade retida após cada etapa de purificação, como um percentual da atividade do extrato bruto. A atividade do extrato bruto é considerada 100%.

Nível de purificação. Este parâmetro é a medida do aumento de pureza e é obtido através da divisão da atividade específica, calculada após cada etapa de purificação, pela atividade específica do extrato inicial.

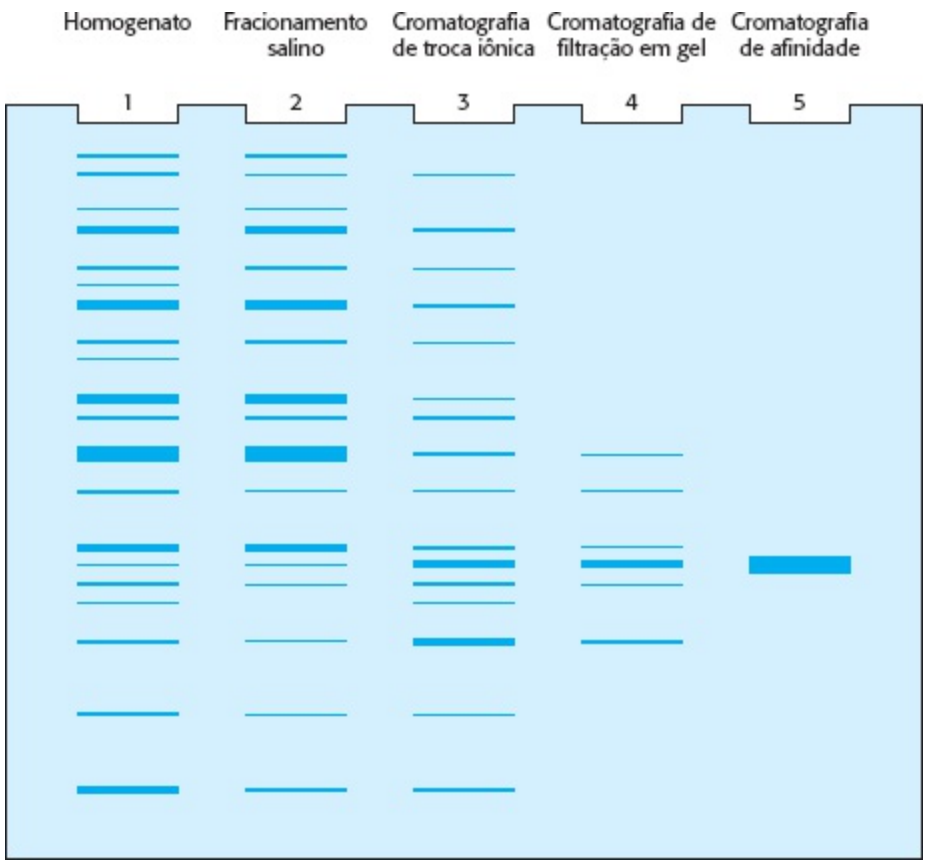


Figura 3.14 Análise eletroforética da purificação de uma proteína. O esquema de purificação na Tabela 3.1 foi analisado por SDSPAGE. Cada raia continha 50 µg de amostra. A eficácia da purificação pode ser vista à medida que a faixa para a proteína de interesse se torna mais destacada em relação às outras.

Como podemos ver na Tabela 3.1, a primeira etapa de purificação, o fracionamento salino, leva a um aumento de pureza de apenas três vezes, mas recuperamos praticamente toda a proteína do extrato original, uma vez que o rendimento é de 92%. Após a diálise para diminuir a concentração de sal restante do fracionamento salino, a fração é passada por uma coluna de troca iônica. A purificação aumenta agora em 9 vezes, comparada com o extrato original, enquanto o rendimento cai para 77%. A cromatografia de filtração em gel traz o nível de purificação a 110 vezes, mas o rendimento agora é de 50%. A etapa final é a cromatografia de afinidade, que usa um ligante específico para a enzima-alvo. Esta etapa, a mais poderosa entre estes procedimentos de purificação, resulta em uma purificação de 3.000 vezes, mas cai o rendimento para 35%. A análise do SDS-PAGE na Figura 3.14 mostra que, se aplicarmos uma quantidade constante de proteína em cada raia após cada etapa, o número de bandas diminui proporcionalmente ao nível de purificação e a quantidade da proteína de interesse aumenta proporcionalmente à proteína total presente.

Um bom esquema de purificação considera tanto os níveis de purificação quanto o rendimento. Um alto nível de purificação com baixo rendimento deixa pouca proteína para experimentação. Um alto rendimento com baixa purificação deixa muitos contaminantes (proteínas outras, que não aquela de interesse) na fração e complica a interpretação dos experimentos subsequentes.

A ultracentrifugação é valiosa para a separação e determinação da massa de biomoléculas

Já vimos que a centrifugação é um método poderoso e geralmente utilizado para a separação dos

componentes de um extrato celular bruto. Esta técnica também é valiosa para a análise das propriedades físicas das biomoléculas. Utilizando a centrifugação, podemos determinar parâmetros como massa e densidade, aprender algo sobre a forma da molécula e investigar as interações entra as moléculas. Para deduzir estas propriedades a partir dos dados de centrifugação, necessitamos uma descrição matemática sobre como uma partícula se comporta quando uma força centrífuga é aplicada.

Uma partícula se moverá por um meio líquido quando submetida a uma força centrífuga. Uma maneira conveniente de quantificar a taxa de movimento é calcular o coeficiente de sedimentação *s* de uma partícula, utilizando a seguinte equação:

$$s = m(1 - \bar{\nu}\rho)/f$$

Em que m é a massa da partícula, $\bar{\nu}$ o volume específico parcial (o inverso da densidade da partícula), ρ é a densidade do meio e *f* é o coeficiente de fricção (uma medida da forma da partícula). A expressão $(1 - \bar{\nu}\rho)$ é a força de flutuação exercida pelo meio líquido.

Os *coeficientes de sedimentação* são expressos em *unidades Sverdberg* (S), igual a 10^{-13} s. Quanto menor for o valor de S, mais lentamente uma molécula se moverá em um campo centrífugo. Os valores de S para algumas biomoléculas e componentes celulares estão listados na Tabela 3.2 e na Figura 3.15.

Diversas conclusões importantes podem ser extraídas a partir da equação anterior:

1. A velocidade de sedimentação de uma partícula depende em parte de sua massa. Uma partícula com mais massa sedimenta mais rápido do que uma com menor massa de mesma forma e densidade.

2. A forma também influencia a velocidade de sedimentação porque afeta o arrasto viscoso. O coeficiente de fricção *f* de uma partícula compacta é menor que aquele de uma partícula estendida de mesma massa. Assim, partículas alongadas sedimentam mais lentamente que as esféricas de mesma massa.

Tabela 3.2 Valores de S e pesos moleculares de algumas proteínas.

Proteína	Valor de S (unidades Sverdberg)	Peso molecular
Inibidor pancreático da tripsina	1	6.520
Citocromo *c*	1,83	12.310
Ribonuclease A	1,78	13.690
Mioglobina	1,97	17.800
Tripsina	2,5	23.200
Anidrase carbônica	3,23	28.800
Concanavalina A	3,8	51.260
Malato desidrogenase	5,76	74.900

Lactado desidrogenase	7,54	146.200

Fonte: T. Creighton, *Proteins,* 2nd ed. (W.H. Freeman and Company, 1993), Tabela 7.1.

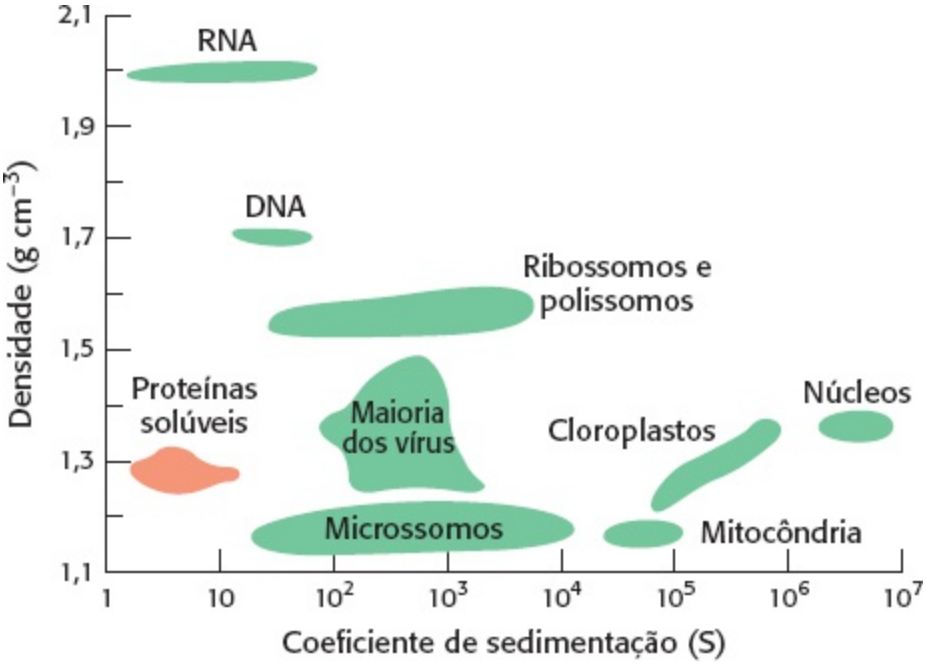


Figura 3.15 Densidades e coeficientes de sedimentação de componentes celulares. [Segundo L. J. Kleinsmith e V. M. Kish, *Principles of Cell and Molecular Biology,* 2nd ed. (HarperCollins, 1995), p.138.]

3. Uma partícula densa move-se mais rapidamente que uma menos densa porque a força de flutuação opositiva $(1 - \bar{\nu}\rho)$ é menor para a partícula mais densa.

4. A velocidade de sedimentação também depende da densidade da solução (ρ). As partículas afundam quando $\bar{\nu}\rho < 1$, boiam quando $\bar{\nu}\rho > 1$ e não se movem quando $\bar{\nu}\rho = 1$,

Uma técnica chamada de *centrifugação zonal* ou *centrifugação em banda,* ou ainda mais comumente *centrifugação em gradiente,* pode ser utilizada para separar proteínas com coeficientes de sedimentação diferentes. A primeira etapa é formar um gradiente de densidade em um tubo de centrifugação. Proporções diferentes de uma solução de baixa densidade (como sacarose a 5%) e uma solução de alta densidade (como sacarose a 20%) são misturadas para criar um gradiente linear de concentração de sacarose, variando entre 20% na base do tubo a 5% no topo (Figura 3.16). O papel do gradiente é prevenir fluxos por convecção. Um pequeno volume de solução contendo a mistura de proteínas a serem separadas é aplicado ao topo do gradiente de densidade. Quando o rotor gira, as proteínas se movem pelo gradiente e se separam de acordo com seus coeficientes de sedimentação. O tempo e a velocidade da centrifugação são determinados empiricamente. As bandas ou zonas de proteínas separadas podem ser extraídas fazendo-se um furo na base do tubo e coletando-se as gotas.

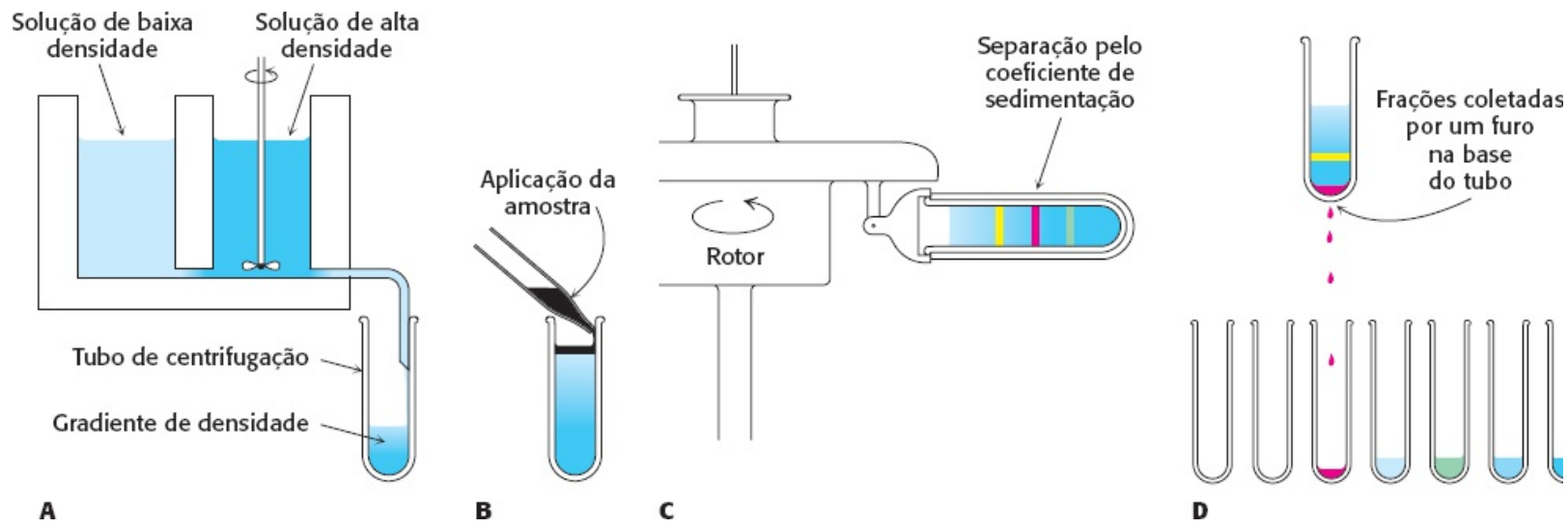


Figura 3.16 Centrifugação zonal. As etapas são as seguintes: **A.** formação de um gradiente de densidade, **B.** aplicação da amostra no topo do gradiente, **C.** colocação do tubo em uma centrífuga de balde oscilante, e sua centrifugação, **D.** coleta das amostras. [Segundo D. Freifelder, *Physical Biochemistry,* 2nd ed. (W. H. Freeman and Company, 1982), p.397.]

As gotas podem ser analisadas quanto ao conteúdo de proteínas e atividade catalítica ou outra propriedade funcional. Esta técnica de velocidade de sedimentação prontamente separa proteínas que difiram em coeficientes de sedimentação por um fator de dois ou mais.

A massa da proteína pode ser determinada diretamente pelo *equilíbrio de sedimentação,* no qual uma amostra é centrifugada em baixa velocidade, de forma que um gradiente de concentração seja formado. No entanto, esta sedimentação é contrabalanceada pela difusão da amostra, das regiões de maior para menor concentração. Quando o equilíbrio é atingido, a forma do gradiente final depende apenas da massa da amostra. *A técnica de sedimentação por equilíbrio para a determinação da massa é muito precisa e pode ser aplicada sem a desnaturação das proteínas, de forma que a estrutura quaternária nativa das proteínas multiméricas é preservada.* Ao contrário, a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida fornece uma *estimativa* da massa das cadeias polipeptídicas dissociadas sob condições de *desnaturação.* Observe que, se sabemos a massa dos componentes dissociados em uma proteína multimérica, como determinado pela análise em SDS-poliacrilamida, e a massa do multímero intacto, por meio da análise de equilíbrio de sedimentação, podemos determinar o número de cópias de cada cadeia polipeptídica presente em um complexo proteico.

A purificação de proteínas pode se tornar mais fácil com o uso da tecnologia de DNA recombinante

No Capítulo 5, consideraremos os amplos efeitos da tecnologia de DNA recombinante em todas as áreas da bioquímica e biologia molecular. A aplicação dos métodos recombinantes para a produção em larga escala de proteínas permitiu expressivos avanços em nossa compreensão sobre suas estrutura e função. Antes do advento desta tecnologia, as proteínas eram isoladas apenas a partir de suas fontes nativas, em geral exigindo uma grande quantidade de tecido para obter uma quantidade suficiente de proteína para um estudo analítico. Por exemplo, a purificação da desoxirribonuclease em 1946 exigiu aproximadamente 5 quilogramas de pâncreas bovino para fornecer um grama de proteína. Como resultado, os estudos bioquímicos de material purificado era frequentemente limitado às proteínas abundantes.

Munidos com as ferramentas da tecnologia recombinante, o bioquímico agora é capaz de

aproveitar diversas vantagens significativas:

1. *As proteínas podem ser expressas em grandes quantidades*. O homogenato serve como ponto de partida para o esquema de purificação de proteínas. Para sistemas recombinantes, o organismo hospedeiro que é passível de manipulação genética, como a bactéria *Escherichia coli* ou a levedura *Pichia pastoris*, é utilizado para expressar a proteína de interesse. O bioquímico pode explorar os curtos tempos de duplicação e a facilidade da manipulação genética de tais organismos para produzir grandes quantidades de proteínas a partir de quantidades viáveis de cultura. Como resultado, a purificação pode começar a partir de um homogenato que é geralmente farto da molécula de interesse. Além disso, uma proteína pode ser facilmente obtida, independentemente de sua abundância natural ou sua espécie de origem.

2. *Marcadores de afinidade podem ser incorporadas às proteínas.* Como descrito anteriormente, a cromatografia pode ser uma etapa altamente seletiva em um esquema de purificação de proteínas. A tecnologia de DNA recombinante permite a adesão de qualquer "etiqueta", entre muitas possíveis (como a "etiqueta His" mencionada anteriormente), a uma proteína. Assim, os benefícios da cromatografia de afinidade podem ser aproveitados mesmo para aquelas proteínas para as quais não se conhecem ligantes – ou quando estes não são facilmente determinados.

3. *Proteínas com estruturas primárias modificadas podem ser facilmente geradas.* Um poderoso aspecto da tecnologia de DNA recombinante aplicado à purificação de proteínas é a capacidade de manipular os genes para gerar variantes de uma sequência da proteína nativa (Seção 5.2). Aprendemos na Seção 2.4 que muitas proteínas são constituídas por domínios compactos conectados por regiões flexíveis de ligação. Com o uso de estratégias de manipulação genética, fragmentos de uma proteína que abrangem domínios únicos podem ser gerados, uma abordagem vantajosa quando a expressão de toda a proteína é limitada por seu tamanho ou solubilidade. Adicionalmente, como veremos na Seção 9.1, as substituições de aminoácidos podem ser introduzidas em sítios ativos de uma enzima para testar precisamente os papéis de resíduos específicos dentro de seus ciclos catalíticos.

3.2 As sequências de aminoácidos das proteínas podem ser determinadas experimentalmente

A sequência de aminoácidos de uma proteína pode ser uma fonte valiosa de perspectivas sobre sua função, estrutura e história.

1. *A sequência de uma proteína de interesse pode ser comparada com todas as sequências conhecidas para averiguar se há similaridades*. Uma busca comparativa entre uma proteína recém-sequenciada e as milhares de proteínas previamente sequenciados leva apenas as alguns segundos em um computador normal (Capítulo 6). Se a proteína recém-isolada for um membro de uma classe estabelecida de proteínas, podemos começar a inferir informações sobre a estrutura e função desta proteína. Por exemplo, a quimiotripsina e a tripsina são membros de uma família de serino-proteases, um clã de enzimas proteolíticas que têm um mecanismo catalítico comum com base em um resíduo de serina reativo (Capítulo 9). Se a sequência da nova proteína isolada mostra similaridades de

sequência com a tripsina e a quimiotripsina, o resultado sugere que ela pode ser uma serino-protease.

2. *A comparação de sequências da mesma proteína em diferentes espécies fornece um enriquecimento de informações sobre as vias evolutivas.* Relações genealógicas entre espécies podem ser inferidas a partir de diferenças entre suas proteínas. Se assumirmos que a taxa de mutações aleatórias das proteínas ao longo do tempo é constante, então a comparação minuciosa da sequência de proteínas relacionadas entre dois organismos pode fornecer uma estimativa de quando estas duas linhas evolutivas divergiram. Por exemplo, uma comparação entre a albumina sérica encontrada em primatas indica que os seres humanos e os macacos africanos divergiram há 5 milhões de anos, e não há 30 milhões de ano, como um dia se pensou. As análises de sequência abriram uma nova perspectiva sobre o registro fóssil e o caminho evolutivo da espécie humana.

3. *Repetições internas podem ser procuradas em meio às sequências de aminoácidos.* Tais repetições internas revelam a história própria de uma proteína específica. Muitas proteínas aparentemente tiveram origem por multiplicação de genes primordiais, seguidas por sua diversificação. Por exemplo, a calmodulina, um sensor onipresente de cálcio em eucariotos, contém quatro módulos ligantes de cálcio semelhantes que foram originados por duplicação gênica (Figura 3.17).

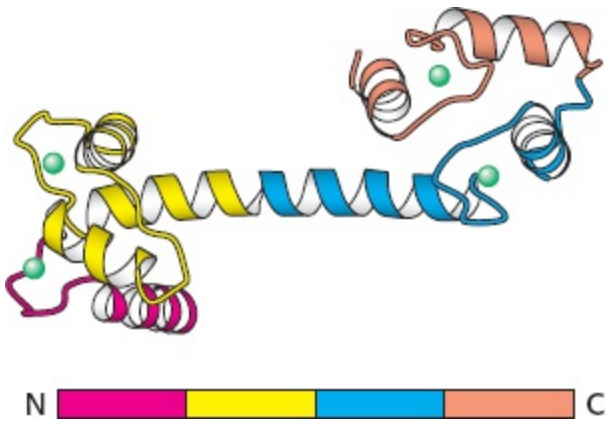


Figura 3.17 Motivos repetitivos em uma cadeia proteica. A calmodulina, um sensor de cálcio, contém quatro unidades similares (mostradas em vermelho, amarelo, azul e laranja) em uma única cadeia polipeptídica. Repare que cada unidade liga um íon de cálcio (mostrado em verde). [Desenhada a partir de 1CLL.pdb.]

4. *Muitas proteínas contêm sequências de aminoácidos que servem como sinais que designam seus destinos ou controlam seu processamento.* Por exemplo, uma proteína destinada à exportação ou para localizar-se na membrana contém uma *sequência sinalizadora*, um fragmento de aproximadamente 20 resíduos hidrofóbicos, próximo à extremidade aminoterminal, que direciona a proteína à membrana apropriada. Outra proteína pode conter outra sequência de aminoácidos que funciona como um *sinal de localização nuclear*, direcionando a proteína ao núcleo.

5. *Os dados de sequenciamento fornecem a base para a preparação de anticorpos específicos para a proteína de interesse.* Uma ou mais partes de uma sequência de aminoácidos de uma proteína eliciará um anticorpo quando injetada em um camundongo ou coelho. Estes anticorpos específicos podem ser muito úteis na determinação da quantidade de proteína presente em solução ou no sangue, na verificação de sua distribuição em uma célula ou na clonagem de seu gene (Seção 3.3).

6. *As sequências de aminoácidos são valiosas para produzir sondas de DNA específicas para*

genes que codificam a proteína correspondente. O conhecimento sobre a estrutura primária de uma proteína permite o uso da genética reversa. As sequências de DNA que correspondem a uma parte da sequência de aminoácidos podem ser construídas com base no código genético. Estas sequências de DNA podem ser utilizadas como sondas para isolar o gene que codifica a proteína, de forma que a sequência completa da proteína seja determinada. O gene, por sua vez, pode fornecer informações valiosas sobre a regulação fisiológica da proteína. O sequenciamento de proteínas é uma parte importante da genética molecular, da mesma forma que a clonagem de DNA é central para a análise da estrutura e função das proteínas. Revisitaremos alguns destes tópicos em detalhes no Capítulo 5.

As sequências peptídicas podem ser determinadas pela degradação de Edman automatizada

Em função da importância da determinação da sequência de aminoácidos de uma proteína, consideremos um dos métodos disponíveis ao bioquímico para obter tal informação. Considere um peptídio simples, cuja composição seja desconhecida para o pesquisador:

Ala-Gly-Asp-Phe-Arg-Gly

O primeiro passo é determinar a *composição de aminoácidos* do peptídio. O peptídio é hidrolisado em seus aminoácidos constituintes por meio do aquecimento em 6 M de HCl a 110°C por 24 h. Os aminoácidos em solução podem então ser separados pela cromatografia de troca iônica. A identidade de cada aminoácido é revelada por seu volume de eluição, que é o volume de tampão usado para remover o aminoácido da coluna (Figura 3.18), e sua quantidade é revelada pela reação com um corante indicador como *ninidrina* ou *fluorescamina*. Após a conjugação com o indicador, o aminoácido exibe uma cor com a intensidade proporcional a sua concentração. Uma comparação de padrões cromatográficos do hidrolisado da nossa amostra com o de uma mistura padrão de aminoácidos deverá mostrar que a composição do peptídio é

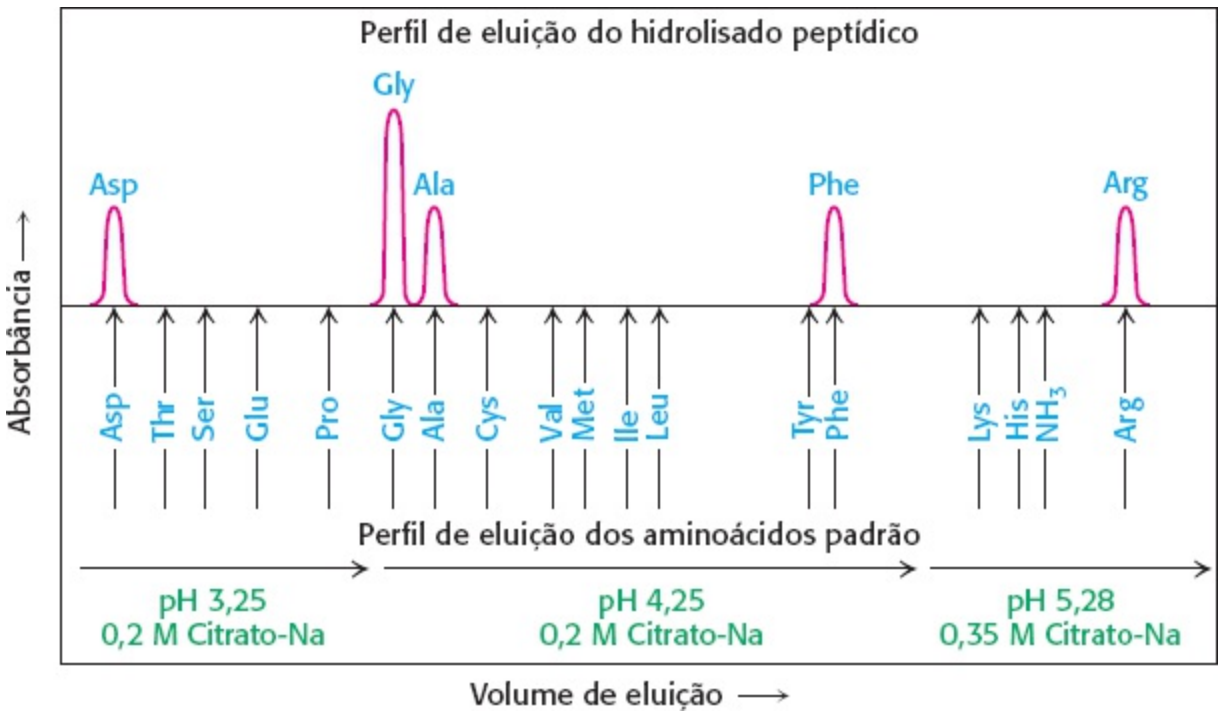
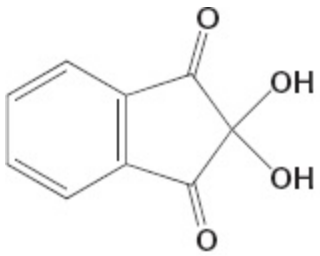


Figura 3.18 Determinação da composição de aminoácidos. Diferentes aminoácidos em um hidrolisado peptídico podem ser separados por cromatografia de troca iônica em uma resina de poliestireno sulfonado (como o Dowex-50). Tampões

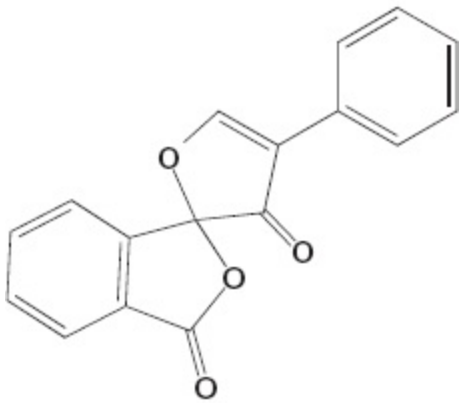
(neste caso, o citrato de sódio) de pH crescente são utilizados para eluir os aminoácidos da coluna. A quantidade de cada aminoácido presente é determinada pela absorbância. O aspartato, que tem uma cadeia lateral ácida, é o primeiro a aparecer, enquanto a arginina, que tem uma cadeia lateral básica, é a última. Descobre-se então que o peptídio original é composto por um aspartato, uma alanina, uma fenilalanina, uma arginina e dois resíduos de glicina.

(Ala, Arg, Asp, Gly_2, Phe)

Os parênteses denotam que esta é a composição de aminoácidos do peptídio, mas não a sua sequência.



Ninidrina



Fluorescamina

O próximo passo é identificar o aminoácido N-terminal. Pehr Edman criou um método para identificar e clivar o resíduo aminoterminal de um peptídio sem desfazer as ligações peptídicas entre os outros resíduos de aminoácidos. A *degradação de Edman* remove sequencialmente um resíduo por vez da extremidade aminoterminal amínica de um peptídio (Figura 3.19). O *fenil isotiocianato* reage com o grupo aminoterminal não carregado de um peptídio para formar um derivado feniltiocarbamoil. Então, sob condições levemente ácidas, um derivado cíclico do aminoácido terminal é liberado, o que deixa intacto o peptídio encurtado em um aminoácido. O composto cíclico é um aminoácido-feniltio-hidantoína (PTH), que pode ser mais uma vez identificado por métodos cromatográficos. O procedimento de Edman pode ser repetido no peptídio encurtado, gerando um novo aminoácido-PTH que pode novamente ser identificado por cromatografia. Mais três ciclos da degradação de Edman revelarão a sequência completa do hexapeptídio original.

O desenvolvimento de sequenciadores automatizados diminuiu marcadamente o tempo necessário para determinar as sequências de proteínas. Por meio de degradações de Edman repetitivas, a sequência de aminoácidos de cerca de 50 resíduos em uma proteína pode ser determinada. Sequenciadores de fase gasosa podem analisar quantidades picomolares de peptídios e proteínas com o uso da cromatografia líquida de alta pressão para identificar cada aminoácido à medida que ele é liberado (Figura 3.20). Esta alta sensibilidade torna viável a análise da sequência de uma

amostra de proteína eluída de uma única banda de um gel de SDS-poliacrilamida.

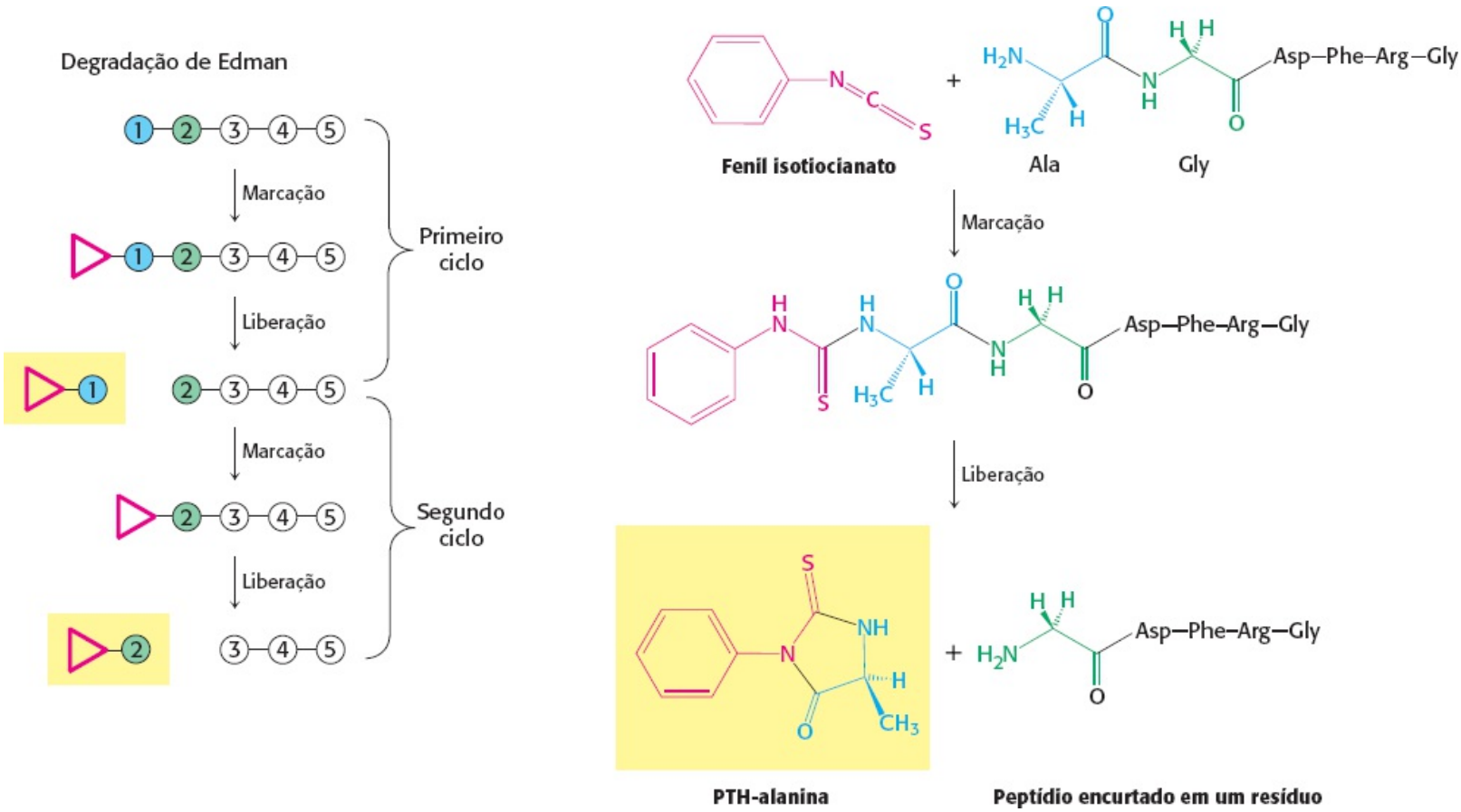


Figura 3.19 Degradação de Edman. O resíduo aminoterminal marcado (PTH-alanina, no primeiro ciclo) pode ser liberado sem que o resto do peptídio seja hidrolisado. De fato, o resíduo aminoterminal do peptídio encurtado (Gly-Asp-Phe-Arg-Gly) pode ser determinado no segundo ciclo. Mais três ciclos da degradação de Edman revelará a sequência completa do peptídio original.

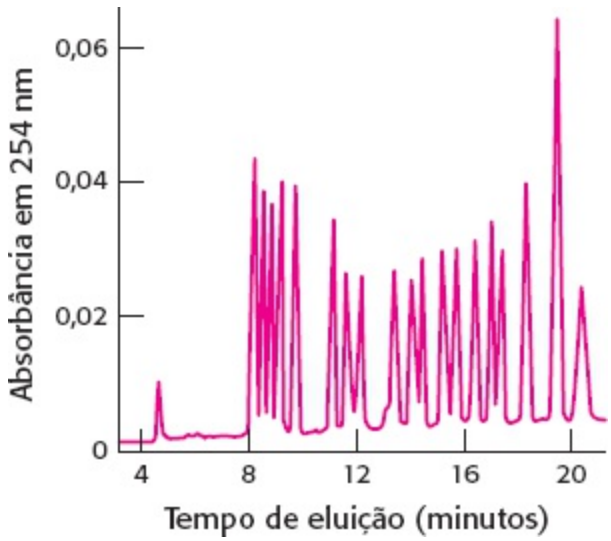


Figura 3.20 Separação do PTH-aminoácido. Os PTH-aminoácidos podem ser rapidamente separados por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Neste perfil de HPLC, uma mistura de PTH-aminoácidos; e claramente separada em seus componentes. Um aminoácido desconhecido pode ser identificado por sua posição de eluição, em comparação com aqueles conhecidos.

As proteínas podem ser fragmentadas em pequenos peptídios para facilitar sua análise

A princípio, seria possível sequenciar uma proteína inteira utilizando o método de Edman. Na

prática, os peptídios não podem conter mais do que aproximadamente 50 resíduos, porque nem todos os peptídios na mistura de reação liberam os derivados de aminoácidos em cada etapa. Por exemplo, se a eficiência de liberação de cada ciclo fosse de 98%, a proporção de aminoácidos "corretamente" liberados depois de 60 ciclos seria de ($0{,}98^{60}$), ou 0,3 – uma mistura inequivocamente impura. Este obstáculo pode ser driblado por meio da clivagem da proteína em pequenos peptídios que podem ser sequenciados. A clivagem de proteínas pode ser realizada por reagentes químicos, como brometo de cianogênio, ou enzimas proteolíticas, como a tripsina. A Tabela 3.3 fornece várias outras maneiras de clivagem específica de cadeias polipeptídicas. Observe que todos estes métodos são específicos para a sequência: eles quebram o arcabouço proteico em resíduos de aminoácidos específicos, de uma maneira conhecida.

Tabela 3.3 Clivagem específica de polipeptídios.

Reagente	Local de clivagem
Clivagem química	
Brometo de cianogênio	Lado carboxila das metioninas
O-iodosobenzoato	Lado carboxila dos triptofanos
Hidroxilamina	Ligações asparagina-glicina
2-Nitro-5-Tiocianobenzoato	Lado amino das cisteínas
Clivagem enzimática	
Tripsina	Lado carboxila da lisina e da arginina
Clostripaína	Lado carboxila da arginina
Protease estafilocócica	Lado carboxila do aspartato e do glutamato (do glutamato apenas sob certas condições)
Trombina	Lado carboxila da arginina
Quimiotripsina	Lado carboxila da tirosina, triptofano, fenilalanina, leucina e metionina
Carboxypeptidase A	Lado amino do aminoácido C-terminal (excluindo arginina, lisina e prolina)

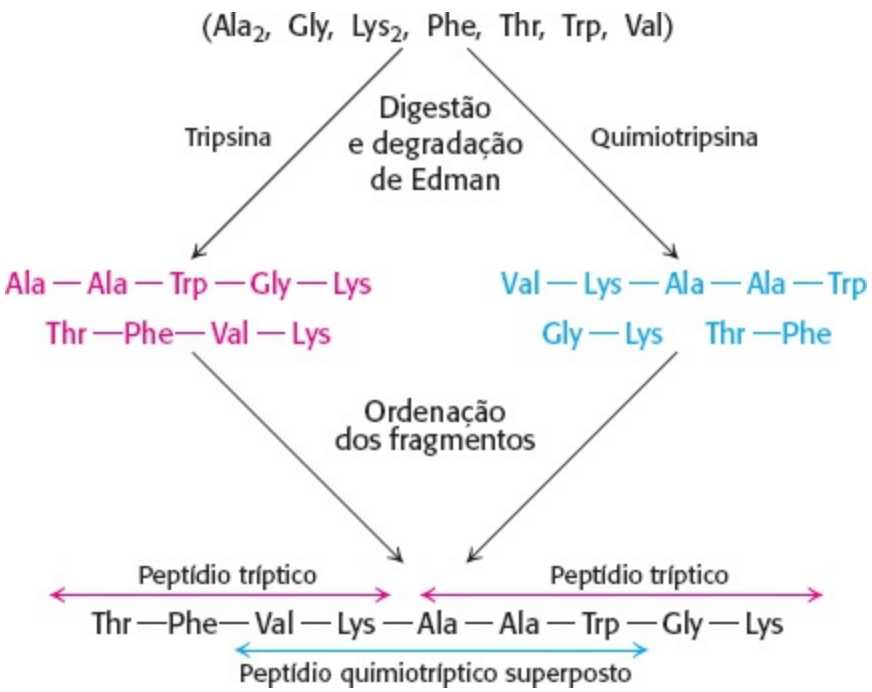


Figura 3.21 Superposição de peptídios. Os peptídios obtidos por digestão quimiotríptica superpõem dois peptídios trípticos, estabelecendo sua ordem.

Os peptídios obtidos por clivagens enzimática ou química específicas são separados por algum tipo de cromatografia. A sequência de cada peptídio purificado é então determinada pelo método de Edman. Neste ponto, as sequências de aminoácidos dos segmentos da proteína são conhecidas, mas a ordem destes segmentos ainda não é definida. Como podemos ordenar os peptídios para obter a estrutura primária da proteína original? A informação adicional necessária é obtida a partir de *peptídios sobrepostos* (Figura 3.21). Uma segunda enzima é usada para dividir a cadeia polipeptídica em diferentes ligações. Por exemplo, a quimiotripsina quebra preferencialmente as ligações do lado carboxil de resíduos aromáticos e outros resíduos corpulentos não polares (Capítulo 9). Como estes peptídios quimiotrípticos superpõem dois ou mais peptídios trípticos, eles podem ser usados para estabelecer a ordem dos peptídios. A sequência completa de aminoácidos da cadeia polipeptídica é então desvendada.

Etapas adicionais são necessárias se a amostra inicial de proteína for, de fato, diversas cadeias polipeptídicas. A eletroforese de SDS-gel, sob condições redutoras, pode mostrar o número de cadeias. Alternativamente, o número de aminoácidos N-terminais diferentes pode ser determinado. Após a identificação de que a proteína é formada por duas ou mais cadeias polipeptídicas, agentes desnaturantes, como a ureia ou hidrocloreto de guanidínio, são usados para dissociar as cadeias unidas por ligações não covalentes. As cadeias dissociadas devem ser separadas umas das outras antes que a determinação da sequência possa começar. As cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto são separadas por redução com tióis como o β-mercaptoetanol ou ditiotreitol. Para evitar que os resíduos de cisteína se recombinem, eles são então alquilados com iodoacetato para formarem derivados S-carboximetil estáveis (Figura 3.22). O sequenciamento pode então ser realizado, como descrito anteriormente.

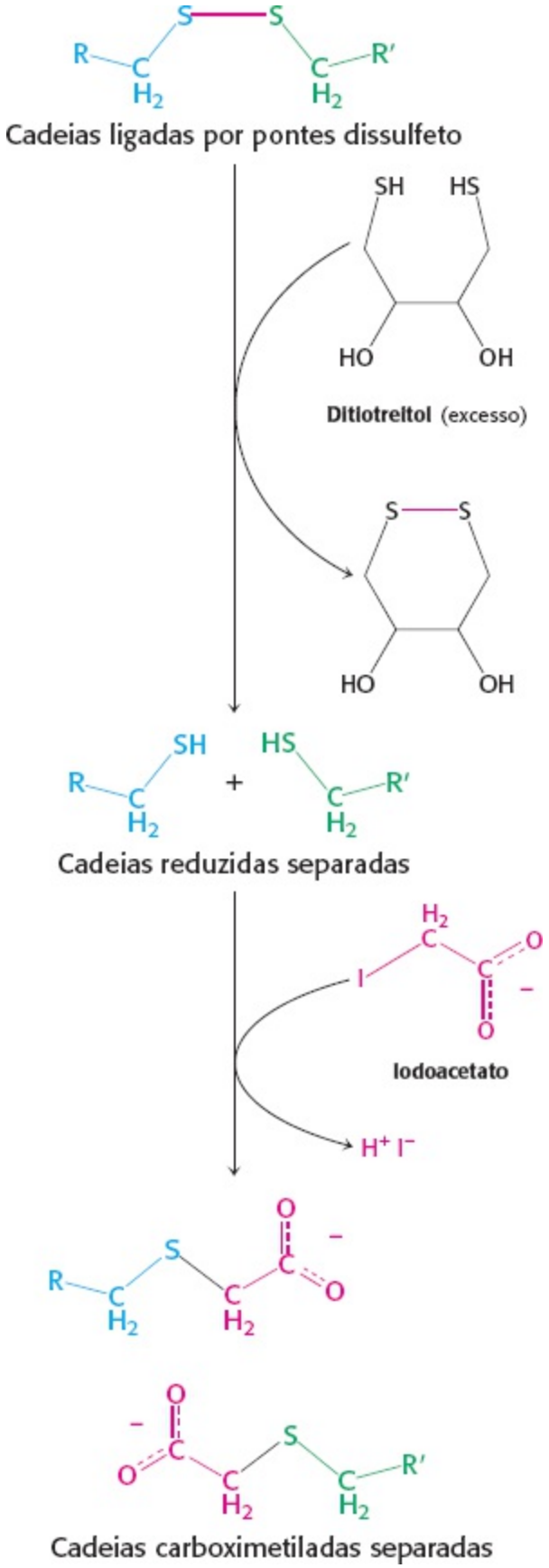


Figura 3.22 Redução de pontes dissulfeto. Polipeptídios ligados por pontes dissulfeto podem ser separados por redução com ditiotreitol seguido de alquilação para prevenir que se restabeleçam.

Os métodos de genômica e proteômica são complementares

Milhares de proteínas foram sequenciadas pela degradação de Edman utilizando os peptídios obtidos por clivagens específicas. No entanto, requer-se um grande trabalho para elucidar a sequências de

grandes proteínas, aquelas com mais de 1.000 resíduos. Para sequenciar tais proteínas, uma abordagem experimental baseada na tecnologia de DNA recombinante é geralmente mais eficiente. Como será abordado no Capítulo 5, longas sequências de DNA podem ser clonadas e sequenciadas, e a sequência nucleotídica pode ser traduzida, de modo a revelar a sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene (Figura 3.23). A tecnologia de DNA recombinante está produzindo uma enorme quantidade de sequências de aminoácidos em uma velocidade formidável.

Figura 3.23 A sequência de DNA fornece a sequência de aminoácidos. A sequência completa de nucleotídios do HIV-1 (vírus da imunodeficiência humana), a causa da AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida), foi determinada 1 ano após o isolamento do vírus. Uma parte da sequência de DNA especificada pelo genoma de RNA do vírus é mostrada aqui com a sequência correspondente de aminoácidos (deduzido a partir do conhecimento do código genético).

Mesmo com o uso do sequenciamento de bases de DNA para determinar a estrutura primária, ainda há necessidade de se trabalhar com as proteínas isoladas. A sequência de aminoácidos deduzida a partir da leitura da sequência de DNA é aquela da proteína nascente, o produto direto da tradução. No entanto, muitas proteínas sofrem *modificações pós-traducionais* após sua síntese. Algumas têm suas extremidades aparadas e outras nascem a partir da clivagem de uma grande cadeia polipeptídica inicial. Os resíduos de cisteína em algumas proteínas são oxidados para formar ligações dissulfídicas, conectando tanto partes dentro de uma mesma cadeia quanto cadeias polipeptídicas separadas. As cadeias laterais específicas de algumas proteínas são alteradas. As sequências de aminoácidos derivadas das sequências de DNA são ricas em informação, mas elas não revelam estas modificações. Análises químicas das proteínas em sua forma madura são necessárias para delinear a natureza destas mudanças, críticas para as atividades biológicas da maioria das proteínas. *Assim, análises genômicas e proteômicas são abordagens complementares para elucidar a base estrutural da função das proteínas.*

3.3 A imunologia fornece técnicas importantes para a investigação das proteínas

A purificação de uma proteína permite que o bioquímico explore sua função e sua estrutura em um ambiente precisamente controlado. No entanto, o isolamento de uma proteína a remove de seu contexto natural dentro da célula, onde sua atividade é mais fisiologicamente relevante. Avanços no campo da imunologia (Capítulo 34) têm permitido o uso de anticorpos como reagentes fundamentais para explorar as funções das proteínas dentro da célula. A primorosa especificidade dos anticorpos para com seus alvos proteicos fornece um meio de marcar uma proteína específica de forma que ela possa ser isolada, quantificada ou visualizada.

Anticorpos para proteínas específicas podem ser produzidos

Técnicas imunológicas podem começar com a geração de anticorpos para uma proteína em particular.

Um anticorpo (também chamado de *imunoglobulina,* Ig) é, ele mesmo, uma proteína (Figura 3.24); ele é sintetizado por um animal em resposta à presença de uma substância estranha, chamada de *antígeno.* Anticorpos têm uma afinidade alta e específica para os antígenos que eliciaram sua síntese. A ligação do anticorpo e do antígeno é uma etapa da resposta imune que protege o animal de uma infecção (Capítulo 34). Proteínas estranhas, polissacarídios e ácidos nucleicos podem ser antígenos. Pequenas moléculas estranhas, como peptídios sintéticos, também podem eliciar anticorpos, desde que a pequena molécula esteja ligada a um carreador macromolecular. Um anticorpo reconhece um grupo específico, maior ou menor, de aminoácidos na molécula-alvo, chamado de *determinante antigênico* ou *epítopo.* A especificidade da interação antígeno-anticorpo é uma consequência da complementaridade de forma entre as duas superfícies (Figura 3.25). Os animais têm um repertório muito grande de células produtoras de anticorpos, cada uma produzindo um anticorpo que contém uma superfície única para o reconhecimento do antígeno. Quando um antígeno é introduzido em um animal, ele é reconhecido por algumas poucas células selecionadas desta população, estimulando a proliferação das mesmas. Este processo assegura que mais anticorpos, da especificidade apropriada, serão produzidos.

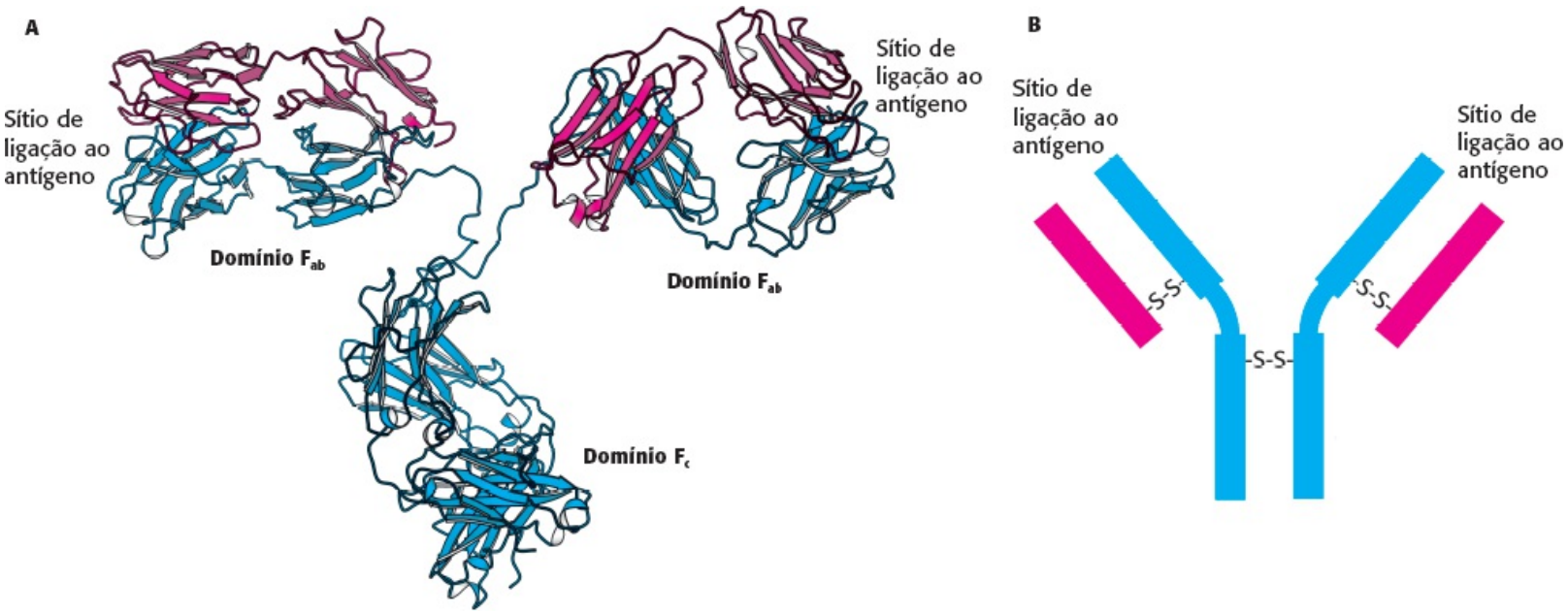


Figura 3.24 Estrutura do anticorpo. A. A imunoglobulina G (IgG) consiste em quatro cadeias, duas pesadas (azul) e duas leves (vermelho), ligadas por pontes dissulfeto. As cadeias pesada e leve unem-se para formar os domínios F_{ab}, que têm os sítios de ligação antígeno anticorpo em suas extremidades. As duas cadeias pesadas formam o domínio F_c. Observe que os domínios F_{ab} são ligados ao domínio F_c por uma ligação flexível. **B.** Uma representação mais esquemática de uma molécula de IgG. [Desenhada a partir de 1IGT.pdb.]

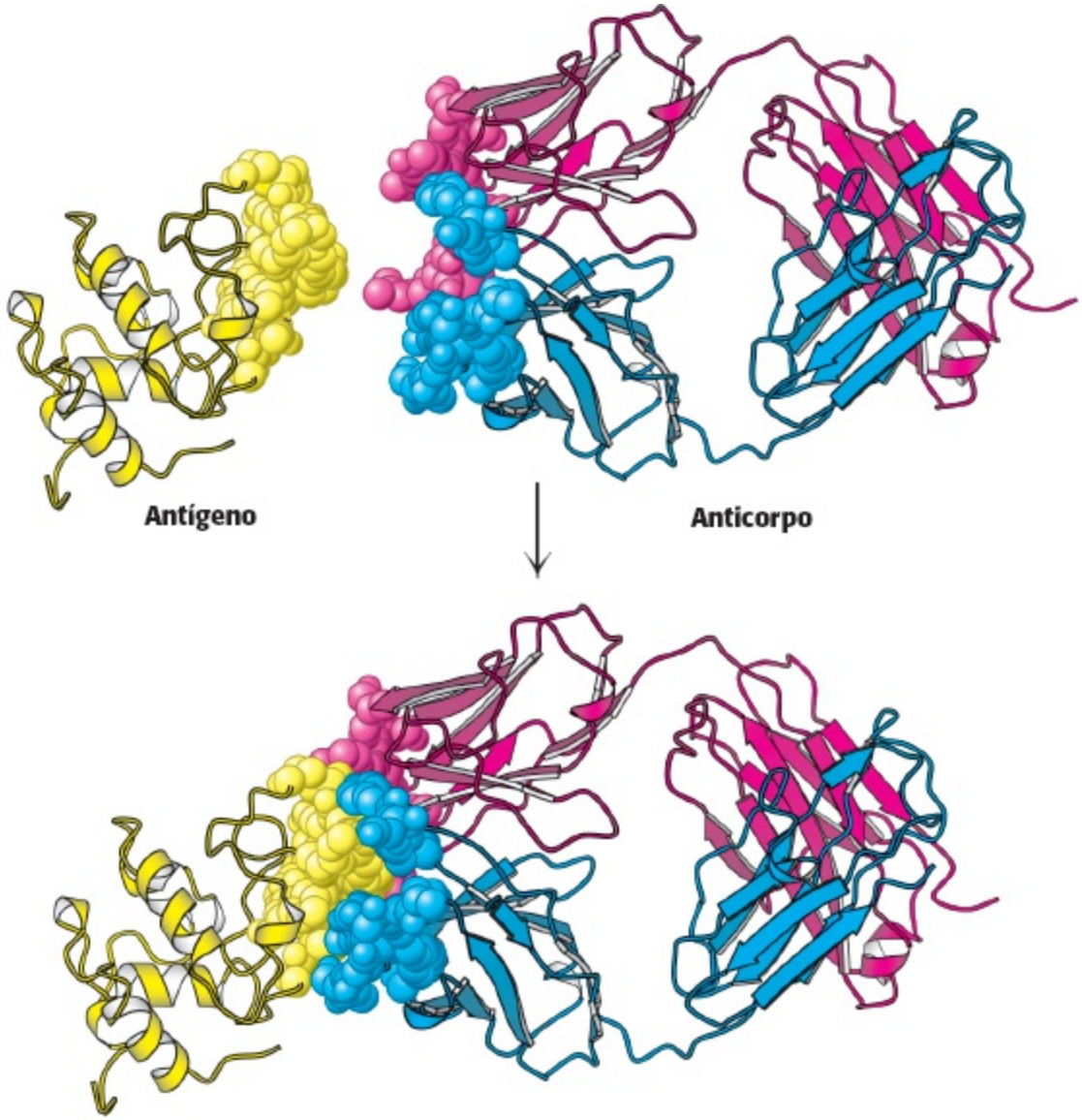


Figura 3.25 Interações antígeno-anticorpo. Um antígeno proteico, neste caso a lisozima, liga-se à extremidade de um domínio F_{ab} de um anticorpo. *Observe* que as extremidades do anticorpo e do antígeno têm formas complementares, permitindo que uma maior superfície seja aprofundada na ligação. [Desenhada a partir de 3HFL.pdb.]

As técnicas imunológicas dependem da capacidade de gerar anticorpos para um antígeno específico. Para obter anticorpos que reconheçam uma proteína em particular, o bioquímico injeta a proteína em um coelho duas vezes, com 3 semanas de intervalo. A proteína injetada age como um antígeno, estimulando a reprodução das células produtoras de anticorpos que a reconhecem. O sangue é retirado do coelho imunizado várias semanas depois e centrifugado para separas as células sanguíneas do sobrenadante, ou soro. O soro, chamado de *antissoro*, contém anticorpos para todos os antígenos aos quais o coelho foi exposto. Apenas alguns deles serão anticorpos contra a proteína injetada. Além disso, anticorpos que reconhecem um antígeno em particular não são espécies moleculares únicas. Por exemplo, o 2,4-dinitrofenol (DNP) foi usado como antígeno para gerar anticorpos. As análises de anticorpos anti-DNP revelaram uma grande faixa de afinidade de ligação; a constante de dissociação variou de 0,1 nM a 1 μM. Analogamente, um grande número de banda foi evidente quando o anticorpo anti-DNP foi submetido à focalização isoelétrica. Estes resultados indicam que as células estão produzindo muitos anticorpos diferentes, cada um reconhecendo uma característica de superfície do mesmo antígeno. Estes anticorpos são chamados de *policlonais*, referindo-se ao fato de que eles são derivados de muitas populações de células produtoras de

anticorpos (Figura 3.26). A heterogeneidade dos anticorpos policlonais pode ser vantajosa para certas aplicações, como a detecção de proteína em baixa abundância, porque cada molécula de proteína pode se ligar a mais do que um anticorpo em vários sítios antigênicos diferentes.

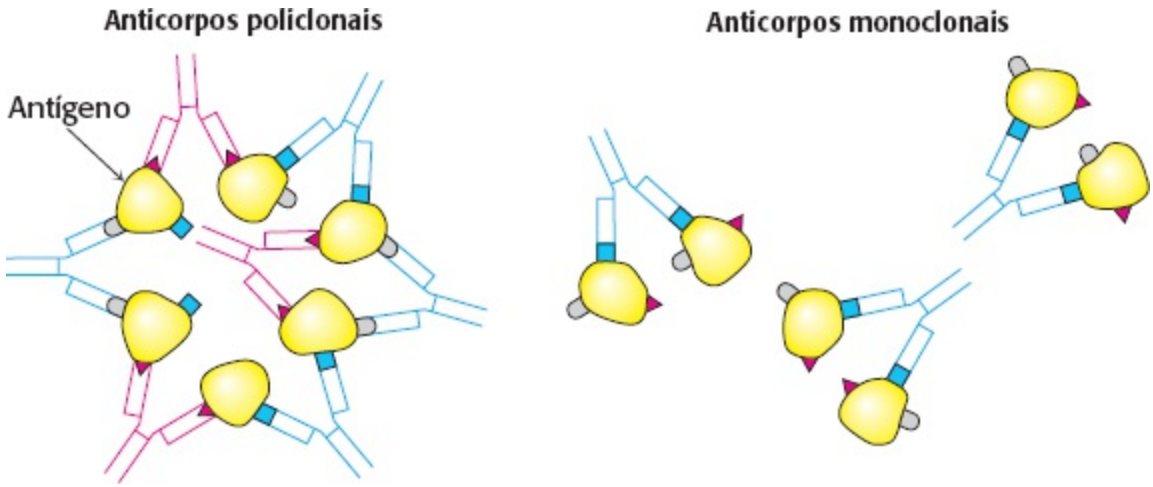


Figura 3.26 Anticorpos poli e monoclonais. A maioria dos antígenos tem diversos epítopos. Os anticorpos policlonais são misturas heterogêneas de anticorpos, cada um específico para um dos vários epitopos em um antígeno. Anticorpos monoclonais são todos idênticos, produzidos por clones de uma única célula produtora de anticorpos; eles reconhecem um epitopo específico. [Segundo R. A. Goldsby, T. J. Kindt, e B. A. Osborne, *Kuby Immunology,* 4th ed. (W. H. Freeman and Company, 2000), p.154.]

Anticorpos monoclonais com praticamente qualquer especificidade desejada podem ser prontamente preparados

A descoberta dos meios de produção dos *anticorpos monoclonais* com praticamente qualquer especificidade desejada foi um grande marco, que intensificou o poder de abordagens imunológicas. Como com as proteínas impuras, trabalhar com uma mistura impura de anticorpos torna difícil a interpretação dos dados. O ideal seria isolar um clone de células produtoras de um único e idêntico anticorpo. O problema é que as células produtoras de anticorpos isoladas de um organismo têm vida curta.

Existem linhagens de células imortais que produzem anticorpos. Elas são derivadas de um tipo de câncer, o *mieloma múltiplo*, que é uma doença maligna das células produtoras de anticorpos. Neste câncer, um único plasmócito transformado se divide incontroladamente, gerando uma grande quantidade de *células de um único tipo.* Este grupo de células é chamado de *clone* porque são descendentes da mesma célula e têm propriedades idênticas. As células idênticas do mieloma produzem grandes quantidades de *imunoglobulina de um único tipo*, geração após geração. Estes anticorpos foram úteis para elucidar a estrutura do anticorpo, mas nada se sabe sobre sua especificidade, de forma que são inúteis para a aplicação nos métodos imunológicos que serão descritos nas próximas páginas.

César Milstein e Georges Köhler descobriram que grandes quantidades de anticorpos de praticamente qualquer especificidade desejada podem ser obtidas a partir da fusão de uma célula produtora de anticorpos de vida breve com uma célula de mieloma. Um antígeno é injetado no camundongo, e o seu baço é removido várias semanas depois (Figura 3.27). Uma amostra de plasmócitos deste baço é misturada, *in vitro*, com células de mieloma. Cada uma das células híbridas resultantes, chamadas de hibridomas, produz indefinidamente o anticorpo idêntico especificado pela

célula genitora do baço. Os hibridomas podem então ser triados por um ensaio específico quanto à interação antígeno-anticorpo para determinar quais deles produz anticorpos com a especificidade preferida. As células que exibem a produção do anticorpo desejado são subdivididas e ressubmetidas ao ensaio. Este processo é repetido até que uma linhagem pura de células, um clone produzindo um único anticorpo, seja isolado. Estas células podem ser cultivadas em meio de cultura ou injetadas em um camundongo para induzir mielomas. Alternativamente, as células também podem ser congeladas e armazenadas por longos períodos.

O método do hibridoma para a produção de anticorpos monoclonais abriu novas possibilidades na biologia e na medicina. Grandes quantidades de anticorpos idênticos, com especificidades sob medida, podem ser rapidamente preparados. Eles são fontes de ideias sobre as relações entre a estrutura do anticorpo e sua especificidade. Além disso, os anticorpos monoclonais podem servir como reagentes analíticos e preparativos precisos. As proteínas que guiam o desenvolvimento foram identificadas pela marcação com anticorpos monoclonais (Figura 3.28). Anticorpos monoclonais ligados a estruturas sólidas podem ser utilizados como colunas de afinidade para purificar proteínas escassas. Este método foi utilizado para purificar 5.000 vezes a interferona (uma proteína antiviral) de uma mistura bruta. Laboratórios clínicos estão usando anticorpos monoclonais em muitos ensaios. Por exemplo, a detecção sanguínea de isozimas que normalmente se localizam no coração sinaliza um infarto do miocárdio. As transfusões de sangue tornaram-se mais seguras por conta da triagem, com anticorpos do sangue doador para vírus que causam AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida), hepatite e outras doenças infecciosas. Os anticorpos monoclonais podem ser usados também como agentes terapêuticos. Por exemplo, o trastuzumabe é um anticorpo monoclonal útil no tratamento de alguns tipos de câncer de mama.

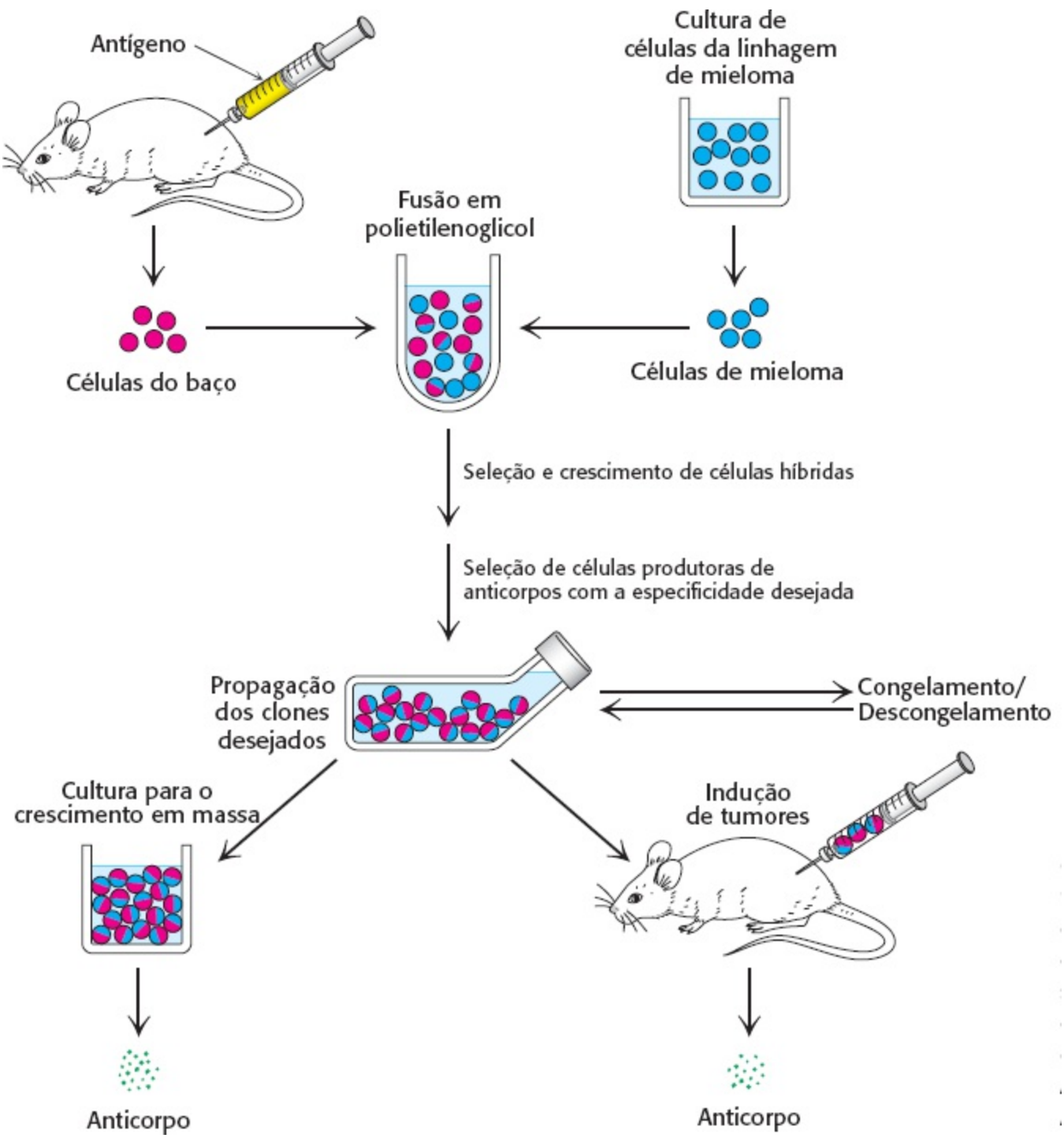


Figura 3.27 Preparo de anticorpos monoclonais. Células de hibridoma são formadas a partir da fusão de células produtoras de anticorpos e células de mieloma. As células híbridas podem proliferar em meio de cultura seletivo. Elas são então triadas para determinar quais produzem o anticorpo de especificidade desejada. [Segundo C. Milstein. Monoclonal Antibodies. Copyright© em 1980 por Scientific American, Inc. Todos os direitos reservados.]

Figura 3.28 Micrografia de fluorescência de um embrião de *Drosophila* em desenvolvimento. O embrião foi corado com um anticorpo monoclonal, marcado com fluorescência, que reconhece a proteína ligante de DNA codificada pelo *engrailed*, um gene essencial para determinação do plano corporal.

As proteínas podem ser detectadas e quantificadas por meio de um ensaio enzimático imunoabsorvente

Os anticorpos podem ser usados como formidáveis reagentes analíticos específicos para a quantificação de proteínas ou outro antígeno presente em uma amostra biológica. O *ensaio enzimático imunoabsorvente* (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) faz uso de uma enzima que reage com um substrato incolor para produzir um produto colorido. A enzima é ligada covalentemente ao anticorpo específico, que reconhece o antígeno-alvo. Se o antígeno estiver presente, o complexo anticorpo-enzima se ligará a ele e, na adição do substrato, a enzima catalisará a reação, gerando o produto colorido. Assim, a presença do produto colorido indica a presença do antígeno. Rápido e conveniente, o ELISA pode detectar menos de um nanograma (10^{-9} g) de uma proteína específica. Um ELISA pode ser executado tanto com anticorpos policlonais quanto com monoclonais, mas os resultados são mais confiáveis com o emprego do último.

Consideraremos dois entre vários tipos de ELISA. *O ELISA indireto é usado para detectar a presença de anticorpos* e é a base do teste para a infecção pelo HIV. O teste de HIV detecta a presença de anticorpos que reconhecem os antígenos do cerne do vírus. As proteínas do cerne do vírus são adsorvidas para a base de uma cuba. Os anticorpos da pessoa que está sendo testada serão adicionados à cuba. Somente uma pessoa infectada pelo HIV terá anticorpos que se ligam ao antígeno. Finalmente, anticorpos que são acoplados a uma enzima e reconhecem anticorpos humanos, como, por exemplo, os caprinos, reagem na cuba, e os anticorpos não ligados são removidos por lavagens. O substrato é então aplicado, e uma reação que fornece um produto colorido indica que os anticorpos ligados à enzima se ligaram aos anticorpos humanos, o que por sua vez significa que o paciente tem anticorpos para o antígeno viral (Figura 3.29A). Além disso, este ensaio é quantitativo:

a reação de colorimétrica é proporcional à quantidade de anticorpos originalmente presentes.

O ELISA em sanduíche é usado para detectar o antígeno, em vez do anticorpo. Um anticorpo para um antígeno em particular é inicialmente adsorvido na base de uma cuba. Em seguida, uma solução contendo o antígeno (como sangue ou urina, em testes diagnósticos clínicos) é adicionado à cuba e se liga ao anticorpo. Finalmente, um segundo anticorpo para o antígeno, diferente do primeiro, é adicionado. Este anticorpo é ligado a uma enzima e processado como descrito para o ELISA indireto. Neste caso, a formação de cor é diretamente proporcional à quantidade de antígeno presente. Consequentemente, ele permite a medida de pequenas quantidades de antígeno (Figura 3.29B).

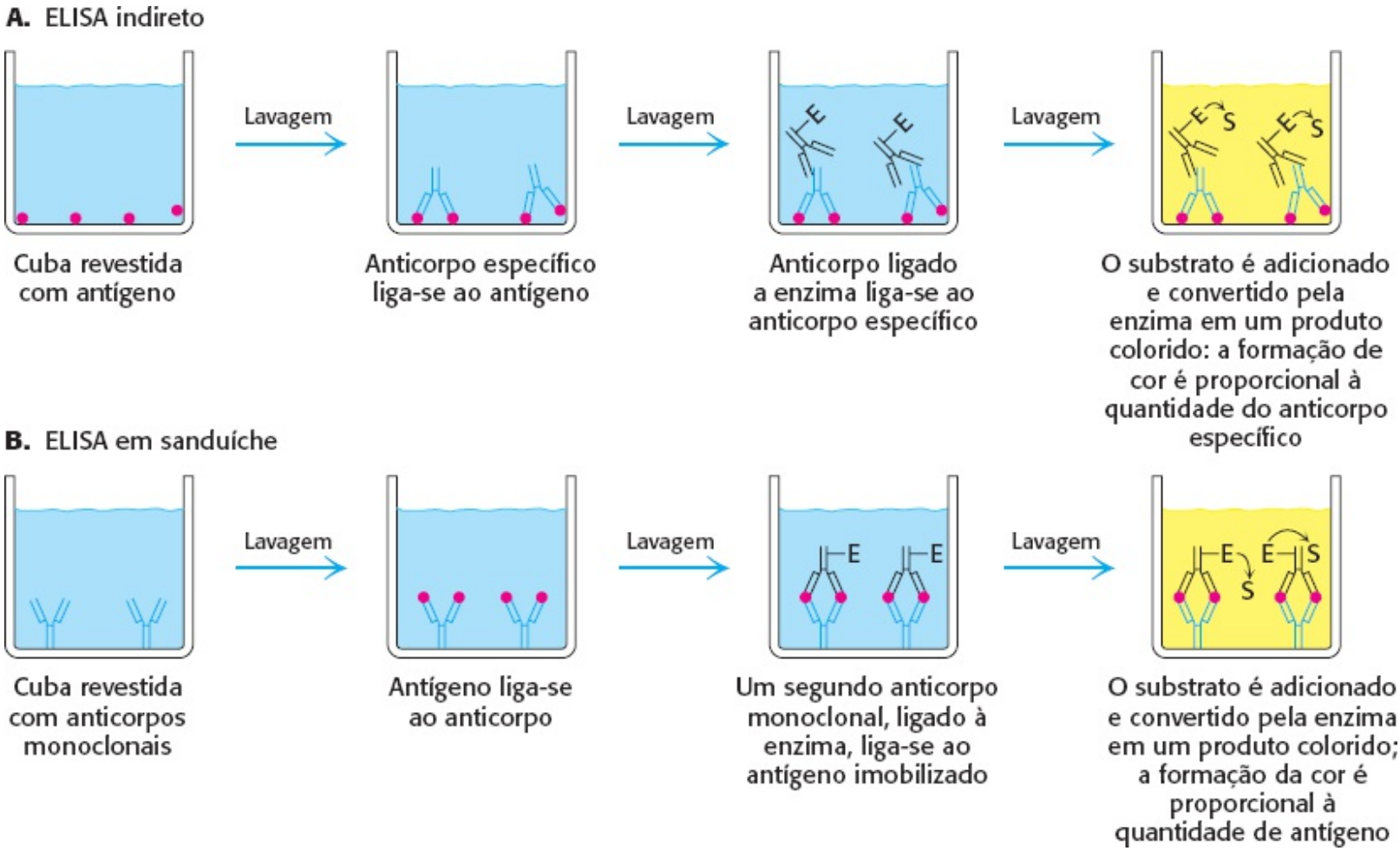


Figura 3.29 ELISA indireto e em sanduíche. **A.** Em um ELISA indireto, a produção de cor indica a quantidade de um anticorpo para um antígeno específico. **B.** Em um ELISA sanduíche, a produção de cor indica a quantidade de antígeno. [Segundo R. A. Goldsby, T. J. Kindt, e B. A. Osborne, *Kuby Immunology*, 4th ed. (W. H. Freeman and Company, 2000), p.162.]

Western blotting possibilita a detecção de proteínas separadas por eletroforese em gel

Quantidades muito pequenas da proteína de interesse em uma célula ou fluido corporal podem ser detectadas por uma técnica de imunoensaio conhecida como *Western blotting* (Figura 3.30). Uma amostra é submetida à eletroforese em um gel de SDS-poliacrilamida. Uma folha de um polímero é pressionada contra o gel, transferindo as proteínas separadas no gel para a folha, o que faz com que as proteínas fiquem mais disponíveis para utilização. Um anticorpo específico para a proteína de interesse é adicionado à folha e reage com o antígeno. O complexo antígeno-anticorpo na folha pode

ser então detectado ao incubar-se a folha com um segundo anticorpo específico contra o primeiro (p.ex., anticorpo caprino que reconhece um anticorpo murino). Um marcador radioativo ou fluorescente no segundo anticorpo permite a identificação e a quantificação da proteína de interesse. De maneira alternativa, uma enzima no segundo anticorpo gera um produto colorido, como no método ELISA. O *Western blot*ting permite encontrar uma proteína em uma mistura complexa, a famosa "agulha no palheiro". Ele é a base para o teste de infecção por hepatite C, em que é usado para detectar uma proteína do cerne do vírus. Esta técnica é também muito útil no monitoramento da purificação de proteínas e na clonagem de genes.

Marcadores fluorescentes tornam possível a visualização de proteínas celulares

A bioquímica é geralmente executada em tubos de ensaios e géis de poliacrilamida. No entanto, a maioria das proteínas funciona em um contexto celular. Marcadores fluorescentes fornecem poderosos meios para examinar proteínas em seus contextos biológicos. As células podem ser coradas com anticorpos marcados com fluorescência, e examinadas por *microscopia de fluorescência* para revelar a localização de uma proteína de interesse. Por exemplo, conjuntos de feixes paralelos são evidentes em células coradas com anticorpos específicos para a actina, a proteína que se polimeriza em filamentos (Figura 3.31). Os filamentos de actina são constituintes do citoesqueleto, o arcabouço interno da célula, que controla sua forma e movimento. Ao acompanhar a localização das proteínas, os marcadores fluorescentes também fornecem pistas sobre a função das proteínas. Por exemplo, a proteína receptora de glicocorticoide liga-se ao hormônio esteroide cortisona. O receptor foi ligado à *proteína fluorescente verde* (GFP, do inglês *green fluorescent protein*), uma proteína fluorescente natural isolada da água viva *Aequorea victoria* (Capítulo 2). A microscopia de fluorescência revela que, na ausência do hormônio, o receptor se localiza no citoplasma (Figura 3.32A). Quando o esteroide é adicionado, o receptor transloca para o núcleo, onde se liga ao DNA (Figura 3.32B). Estes resultados sugeriram que a proteína receptora de glicocorticoide é um fator de transcrição que controla a expressão gênica.

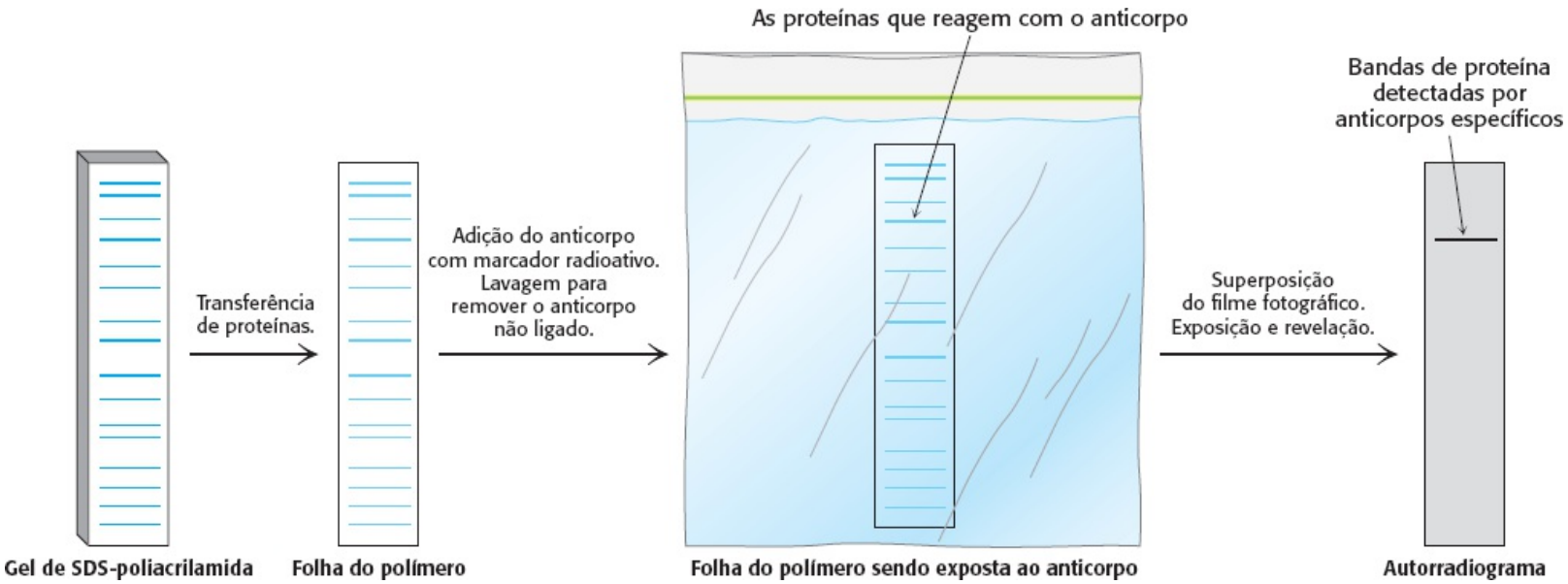


Figura 3.30 *Western blotting*. As proteínas no gel de SDS-poliacrilamida são transferidas para uma folha de polímero e coradas com um anticorpo radioativo. A banda correspondente à proteína a qual o anticorpo se liga aparece no autorradiograma.

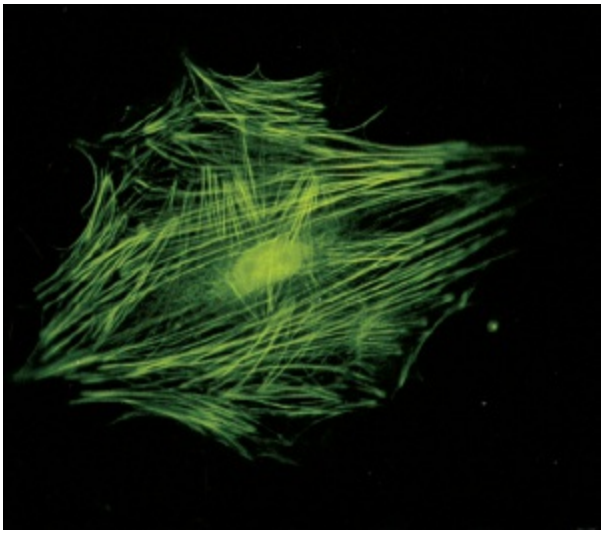


Figura 3.31 Filamentos de actina. A micrografia de fluorescência dos filamentos de actina em uma célula corada com um anticorpo específico para a actina.

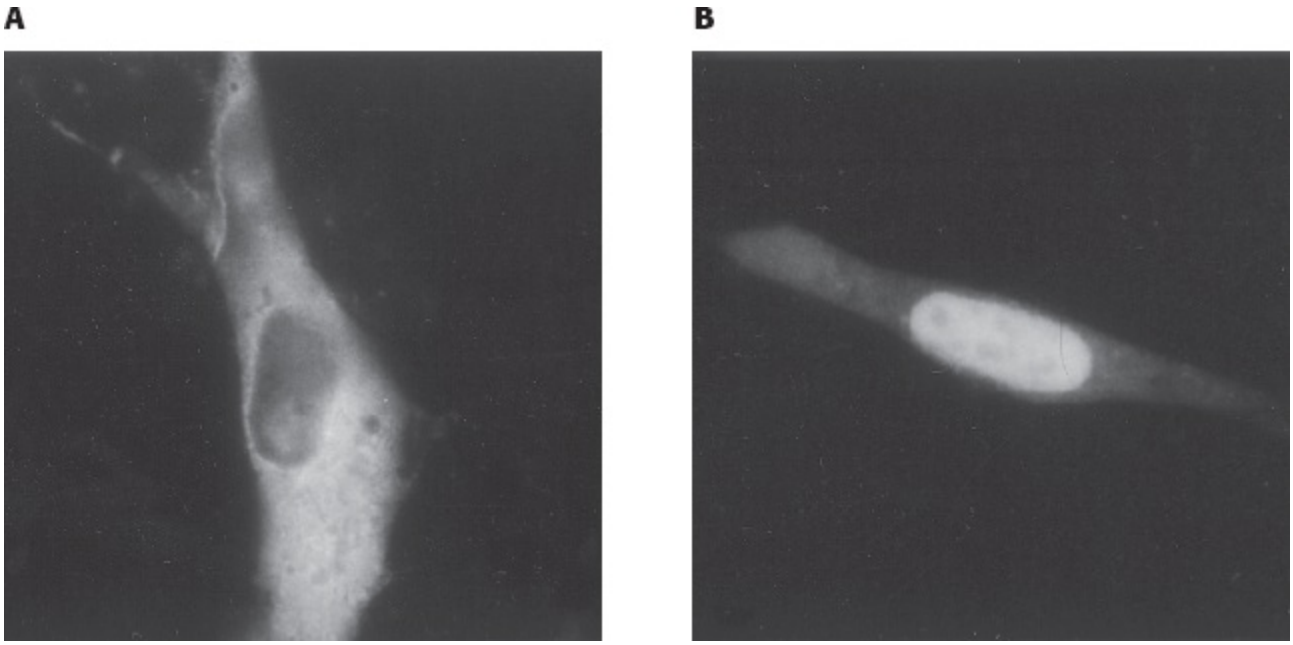


Figura 3.32 Localização nuclear de um receptor esteroide. **A.** O receptor, visível em função de sua ligação com a proteína verde fluorescente, é localizado predominantemente no citoplasma da célula cultivada. **B.** Após o acréscimo de corticosterona (um glicocorticoide), o receptor migra para o núcleo. [Cortesia do Dr. William B. Pratt.]

A maior resolução da microscopia de fluorescência é de aproximadamente 0,2 μM (200 nm ou 2.000 Å), o comprimento de onda da luz visível. Resoluções espaciais mais precisas podem ser obtidas por microscopia eletrônica se os anticorpos forem ligados a marcadores eletrodensos. Por exemplo, anticorpos conjugados ao ouro ou à ferritina (que tem um cerne eletrodenso rico em ferro) são altamente visíveis sob o microscópio eletrônico. A *microscopia imunoeletrônica* pode definir a posição dos antígenos a uma resolução de 10 nm (100 Å) ou ainda menores (Figura 3.33).

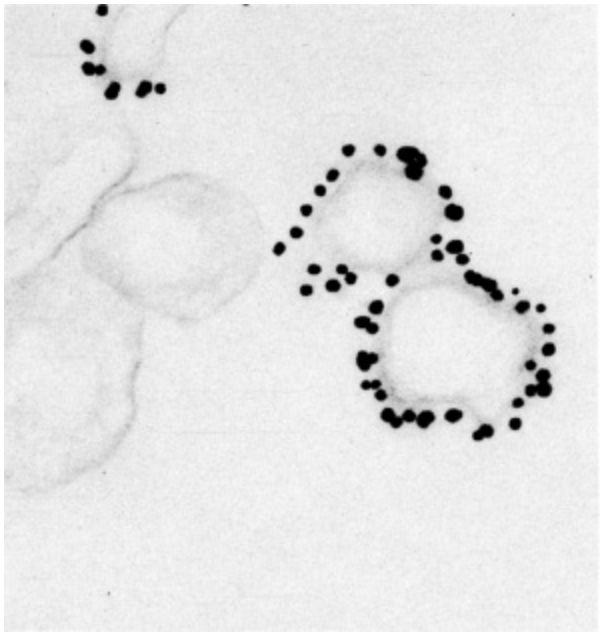


Figura 3.33 Microscopia imunoeletrônica. As partículas opacas (150 Å, ou 15 nm, diâmetro) nesta micrografia eletrônica são conjuntos de átomos de ouro ligados às moléculas de anticorpos. Estas vesículas de membrana das sinapses de neurônios contêm uma proteína de um canal que é reconhecida por este anticorpo específico. [Cortesia do Dr. Peter Sargent.]

3.4 A espectrometria de massa é uma técnica poderosa para a identificação de peptídios e proteínas

Em muitos casos, o estudo de um processo biológico em particular em seu contexto natural é vantajoso. Por exemplo, se estamos interessados em uma via que se localiza no núcleo de uma célula, poderemos conduzir pesquisas em um extrato isolado de núcleo. Geralmente, nestes experimentos, a identificação das proteínas presentes na amostra é essencial. Técnicas baseadas em anticorpos, como a do método ELISA descrito na Seção 3.3, podem ser muito úteis neste sentido. Entretanto, estas técnicas são limitadas à detecção de proteínas para as quais um anticorpo já exista. A espectrometria de massa permite a medida altamente precisa e sensível da composição atômica de uma molécula em particular, ou *analito*, sem o prévio conhecimento de sua identidade. Originalmente este método estava relegado ao estudo da composição química e massa molecular de gases e líquidos voláteis. No entanto, os avanços tecnológicos das últimas duas décadas expandiram muito a utilidade da espectrometria de massa ao estudo das proteínas, mesmo aquelas encontradas em concentrações muito baixas em misturas altamente complexas, como o conteúdo de um tipo celular específico.

A massa de uma proteína pode ser precisamente determinada por espectrometria de massa

A espectrometria de massa permite a detecção altamente precisa e sensível da massa de um analito. Esta informação pode ser usada para determinar a identidade e o estado químico da molécula de interesse. Os espectrômetros de massa operam por meio da conversão das moléculas de analitos em formas gasosas, carregadas (*íons em fase gasosa*). Por meio da aplicação de potenciais eletrostáticos, a razão de massa de cada íon e sua carga (a *razão massa-paracarga*, ou *m/z*) pode ser medida. Embora atualmente uma grande variedade de técnicas seja empregada por espectrômetros de

massa, cada uma delas consiste em três componentes essenciais: a fonte de íons, o analisador de massa e o detector. Consideremos os dois primeiros em maiores detalhes, porque as melhorias que sofreram contribuíram mais significativamente para a análise de amostras biológicas.

A *fonte iônica* alcança a primeira etapa crítica da análise de espectrometria de massa: a conversão do analito em íons na fase gasosa (*ionização*). Até recentemente, as proteínas não podiam ser ionizadas eficientemente por conta de seus altos pesos moleculares e de suas baixas volatilidades. No entanto, o desenvolvimento de técnicas como a *ionização/dessorção a laser assistida por matriz* (MALDI, do inglês *matrix-assisted laser desorption/ionization*) e a *ionização por electrospray* (ESI, do inglês *electrospray ionization*) permitiram a transposição destas barreiras. Na MALDI, o analito é evaporado até a desidratação na presença de um composto aromático, volátil (a *matriz*), que pode absorver luz em comprimentos de ondas específicos. Um pulso de *laser* ajustado a um destes comprimentos de onda excita e vaporiza a matriz, convertendo um pouco do analito em fase gasosa. Colisões gasosas subsequentes permitem a transferência intermolecular de carga, ionizando o analito. Na ESI, uma solução do analito é passada através de um bocal eletricamente carregado. Gotículas do analito, agora carregadas, emergem do bocal em uma câmara de pressão muito baixa, evaporando o solvente e finalmente fornecendo o analito ionizado.

Os íons do analito recém-formados entram no *analisador de massa*, onde eles serão distinguidos com base em suas razões massa-carga. Há muitos tipos diferentes de analisadores de massa. Para esta discussão, consideraremos um dos mais simples, o *analisador de massa por tempo de voo* (TOF, do inglês *time of flight*), no qual os íons são acelerados por uma câmara alongada sob um potencial eletrostático fixo. Considerando dois íons de carga elétrica líquida idêntica, o menor requererá um tempo menor para atravessar a câmara, comparado ao íon maior. A massa de cada íon pode ser determinada por meio da medida do tempo necessário para que cada íon passe pela câmara.

A ação sequencial da fonte iônica e do analisador de massa permite a medida altamente sensível da massa de íons potencialmente pesados, como é o caso das proteínas. Considere o exemplo de uma fonte de íons MALD acoplada a um analisador de massa TOF: o espectrômetro MALDI-TOF (Figura 3.34). Os íons em fase gasosa gerados pela fonte de íons MALDI passam diretamente ao analisador TOF, onde suas razões massa-carga são registradas. Na Figura 3.35, mostramos o espectro de massa do MALDI-TOF de uma mistura de 5 pmol de insulina e 5 pmol de lactoglobulina. As massas determinadas pelo MALDI-TOF são 5.733,9 e 18.364, respectivamente. A comparação com os valores calculados de 5.733,5 e 18.388 revela claramente que a MALDI-TOF é um meio preciso de determinação de massa de proteínas.

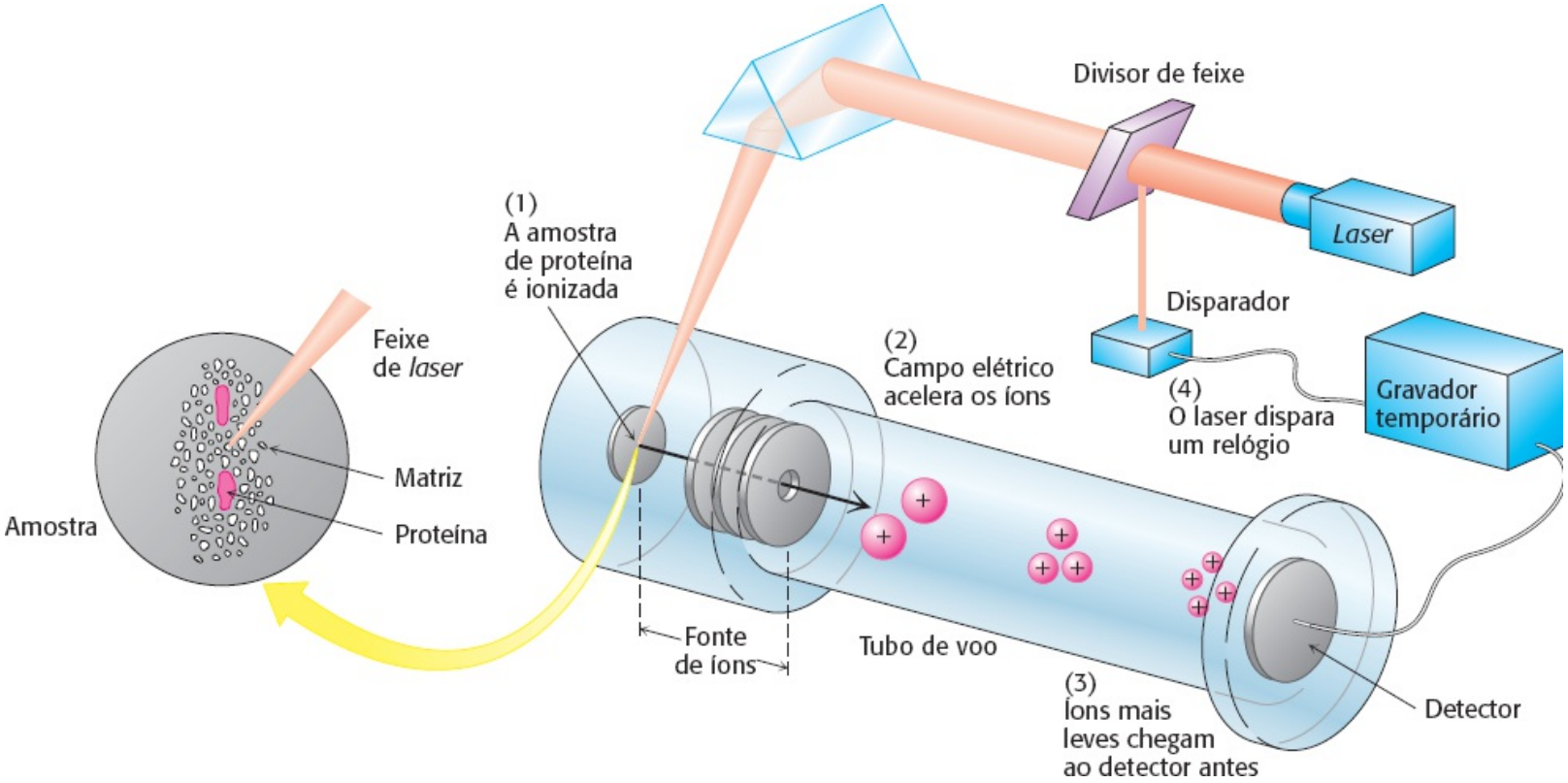


Figura 3.34 Espectrometria de massa MALDI-TOF. (1) A amostra de proteína, embebida em uma matriz apropriada, é ionizada pela aplicação de um feixe de *laser*. (2) Um campo elétrico acelera os íons através de um tubo de voo, em direção ao detector. (3) Os íons mais leves chegam primeiro. (4) O pulso de *laser* ionizante também desencadeia um relógio que mede o tempo de voo (TOF) dos íons. [Segundo J. T. Watson, *Introduction to Mass Spectrometry*, 3rd ed. (Lippincott-Raven, 1997), p.279.]

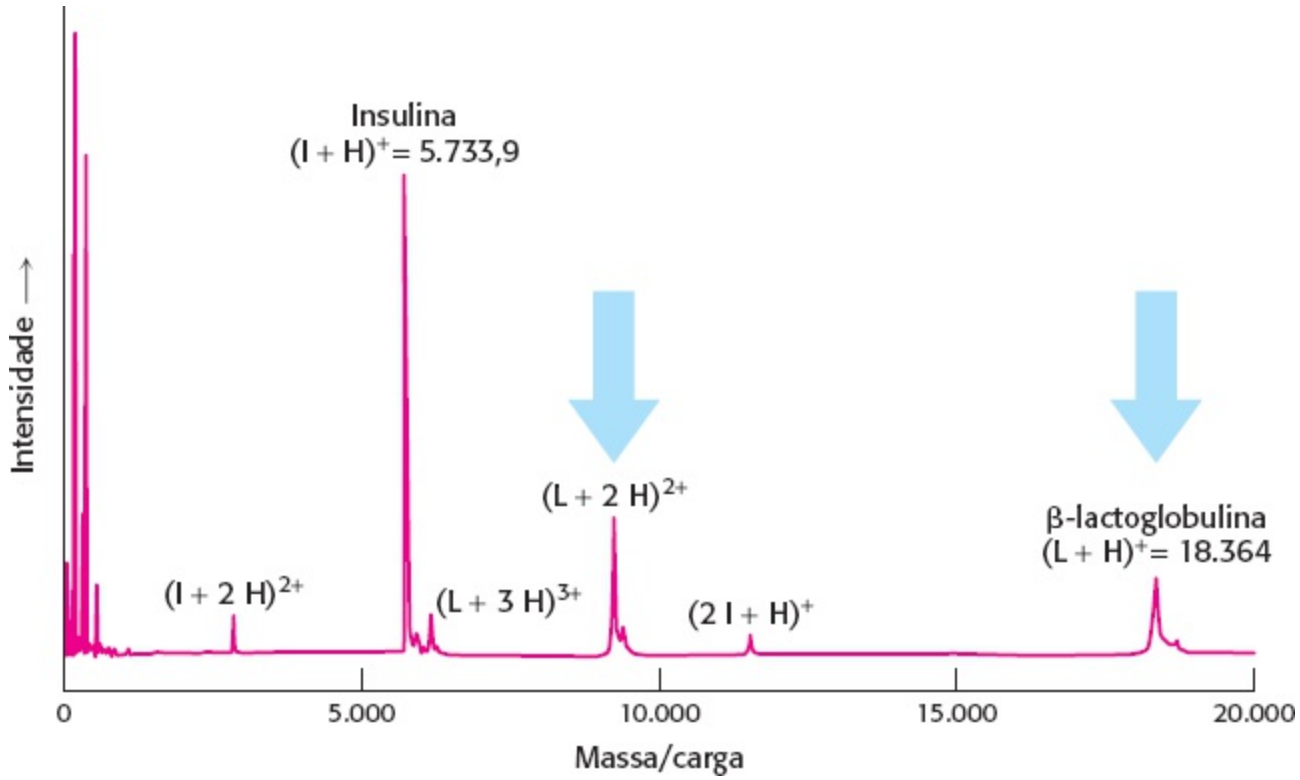


Figura 3.35 Espectro de massa MALDI-TOF da insulina e da β-lactoglobulina. Uma mistura de 5 pmol de insulina e 5 pmol de β-lactoglobulina foi ionizada por MALDI, que produz predominantemente íons com carga unitária provenientes de peptídios e proteínas – o íon de insulina $(I + H)^+$ e o íon de lactoglobulina $(L + H)^+$. As moléculas com cargas múltiplas, como aquelas da β-lactoglobulina indicadas com as flechas azuis, assim como pequenas quantidades do dímero de insulina com carga unitária $(2I + H)^+$, também são produzidas.

No processo de ionização, uma família de íons, cada um com a mesma massa, mas com cargas totais diferentes, é formada a partir de um analito único. Como o espectrômetro de massa detecta íons segundo suas razões massa-carga, estes íons aparecerão como picos separados no espectro de massa. Por exemplo, no espectro de massa da β-lactoglobulina mostrado na Figura 3.35, os picos próximos da *m/z* 18.388 (correspondente ao íon carregado +1) e *m/z* 9.194 (correspondendo ao íon carregado +2) são visíveis (indicados pelas setas azuis). Embora múltiplos picos para o mesmo íon possam parecer sem sentido, eles permitem que o espectrometrista meça a massa de um íon de analito mais de uma vez em um único experimento, aumentando a precisão geral do resultado calculado.

Os peptídios podem ser separados por espectrometria de massa

Anteriormente neste capítulo, a degradação de Edman foi apresentada como um método para identificação da sequência de um peptídio. A espectrometria de massa de fragmentos de peptídios é uma alternativa à degradação de Edman como meio de sequenciamento de proteínas. Os íons de proteínas que foram analisados por um espectrômetro de massa, os *íons-precursores*, podem ser quebrados em cadeias peptídicas menores se forem bombardeados com átomos de um gás inerte, como hélio ou argônio. Estes novos fragmentos ou *íons-produtos*, podem passar por um segundo analisador de massa para caracterização de massa posterior. A utilização de dois analisadores de massa organizados desta maneira é conhecida como *espectrometria de massa sequencial* (*tandem*).

É importante observar que os fragmentos do íon-produto são formados de maneira quimicamente previsível, que podem fornecer pistas sobre a sequência de aminoácidos do íon-precursor. Para analitos peptídicos, os íons-produtos podem ser formados de forma que resíduos de aminoácidos individuais são clivados do íon-precursor (Figura 3.36A). De fato, uma família de íons é detectada; cada íon representa um fragmento do peptídio original com um ou mais aminoácidos removidos de uma extremidade. A Figura 3.36B mostra um espectro de massa representativo de um peptídio fragmentado. As diferenças de massa entre os íons-produtos indicam a sequência de aminoácidos do peptídio íon-precursor.

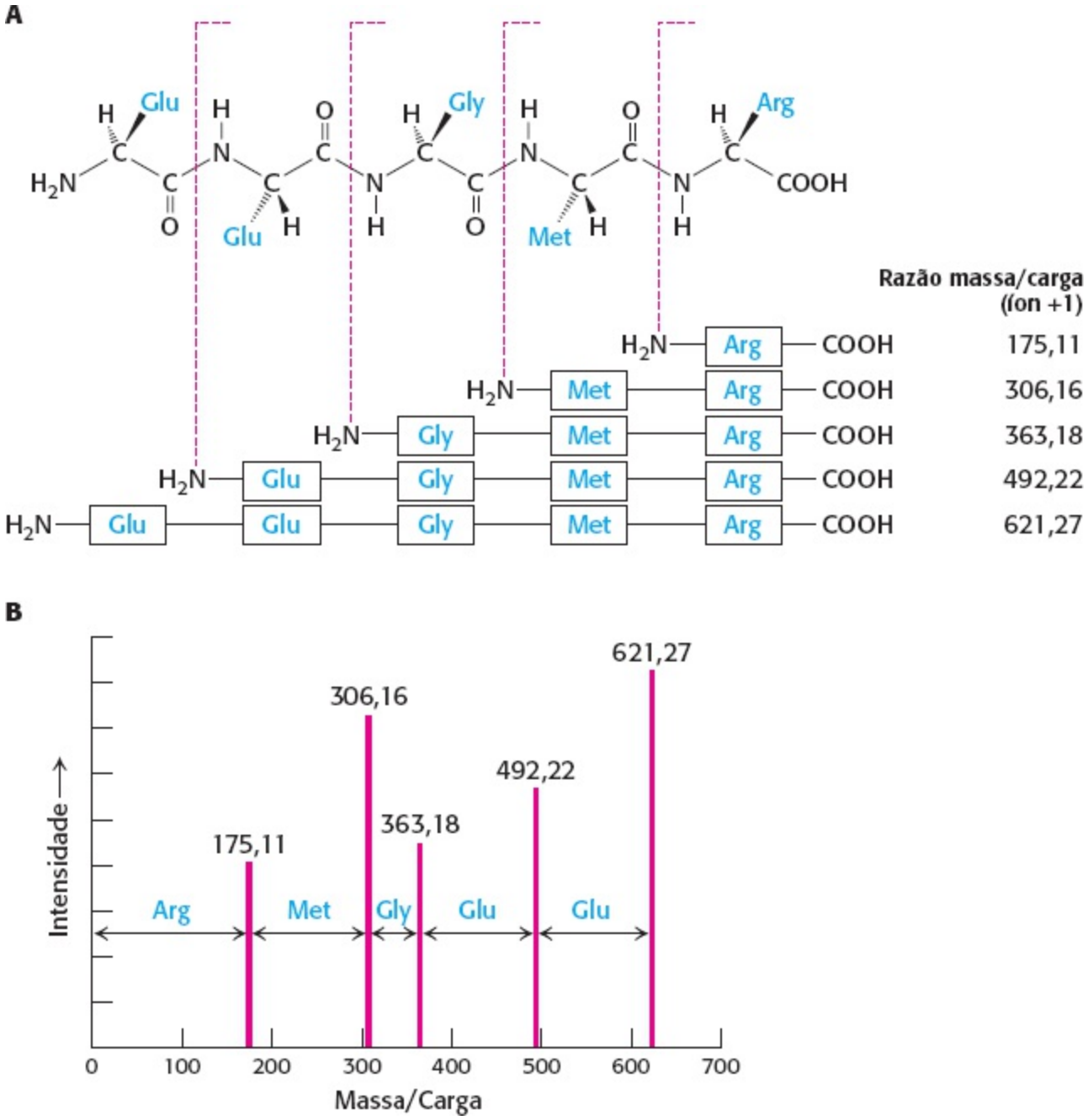


Figura 3.36 Sequenciamento de peptídios por espectrometria de massa tandem. **A.** No espectrômetro de massa, os peptídios podem ser fragmentados pelo bombardeamento com íons de gases inertes para gerar uma família de íons-produtos, nos quais os aminoácidos individuais podem ser removidos de uma extremidade. Como representado aqui, o fragmento carboxila da ligação peptídica rompida é ionizado. **B.** Os íons-produtos são detectados no segundo analisador de massa. As diferenças de massa entre os picos indicam a sequência de aminoácidos do íon-precursor. [Segundo H. Steen e M. Mann, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:699-711, 2004.]

Proteínas individuais podem ser identificadas por espectrometria de massa

A combinação da espectrometria de massa com as técnicas de cromatografia e de clivagem de peptídios, descritas anteriormente neste capítulo, permitem a identificação altamente sensível de proteínas em misturas biológicas complexas. Quando uma proteína é clivada por métodos químicos ou enzimáticos (Tabela 3.3), uma família específica e previsível de peptídios é formada. Aprendemos no Capítulo 2 que cada proteína tem uma sequência única e precisamente definida de aminoácidos. Assim, a identidade de peptídios individuais formados a partir desta reação de clivagem – e, importante, suas massas correspondentes – é uma assinatura distintiva para aquela proteína em particular. A clivagem de proteínas, seguida da separação cromatográfica e pela

espectrometria de massa, permite a rápida identificação e quantificação destas assinaturas, mesmo se elas estiverem presentes em concentrações muito baixas.

Como exemplo da força desta abordagem proteômica, considere a análise do complexo do poro nuclear da levedura, que facilita o transporte de grandes moléculas para dentro e fora do núcleo. Este enorme complexo macromolecular foi purificado de células de leveduras por procedimentos cuidadosos. O complexo purificado foi fracionado por HPLC, seguido por eletroforese em gel. As bandas individuais do gel foram isoladas, clivadas com tripsina e analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF. Os fragmentos produzidos foram comparados com as sequências de aminoácidos deduzidos a partir da sequência de DNA do genoma da levedura, como mostrado na Figura 3.37. Um total de 174 proteínas do poro nuclear foi identificado desta maneira. Muitas destas proteínas não haviam sido identificadas anteriormente como parte do poro nuclear, apesar de anos de estudo. Além disso, os métodos de espectrometria de massa são sensíveis o suficiente para detectar essencialmente todos os componentes do poro se eles estiverem presentes nas amostras utilizadas. Assim, uma lista completa de componentes que constituem este complexo macromolecular pode ser obtida de maneira objetiva. Análises proteômicas deste tipo tornam-se mais fortes à medida que a espectrometria de massa e os métodos de fracionamento bioquímico são refinados.

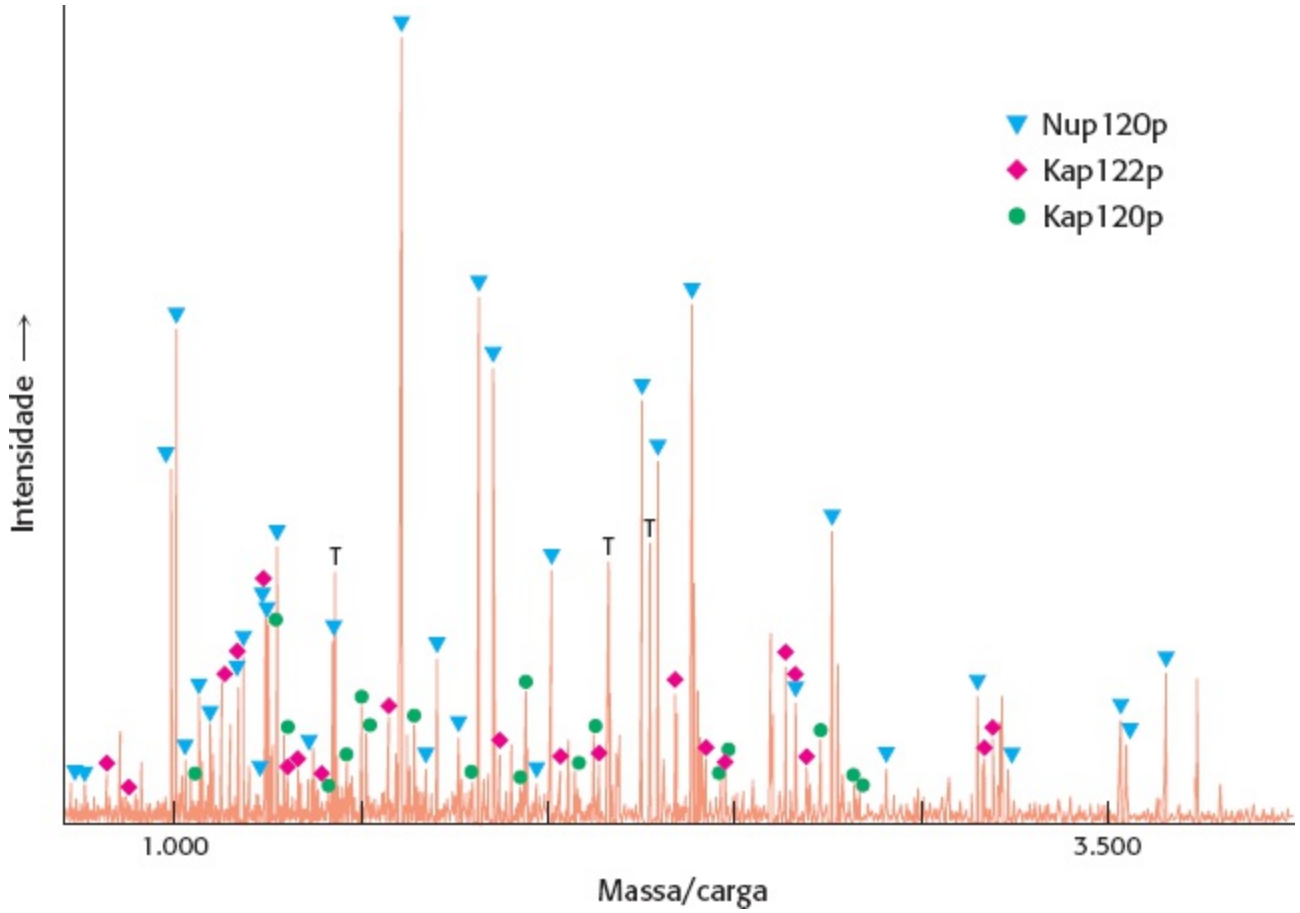


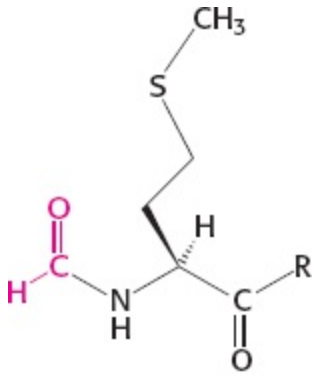
Figura 3.37 Análise proteômica por espectrometria de massa. Este espectro de massa foi obtido ao analisar uma banda de um gel, proveniente de uma amostra de proteína de poro nuclear de levedura, tratada com tripsina. Percebeu-se que muitos dos picos correspondiam às massas previstas para fragmentos de peptídios de três proteínas (Nup120p, Kap122p e Kap120p) do genoma de levedura. A banda correspondia a uma massa molecular aparente de 100kd. [De M. P. Rout, J. D. Aitchison, A. Suprapto, K. Hjertaas, Y. Zhao, e B. T. Chait. *J. Cell Biol.* 148:635-651, 2000.]

3.5 Proteínas podem ser sintetizadas por métodos automatizados em fase sólida

Os peptídios de sequência conhecida podem ser sintetizados para auxiliar análises bioquímicas. Estes peptídios são valiosas ferramentas para muitos objetivos.

1. *Peptídios sintéticos podem servir como antígenos e estimular a formação de anticorpos específicos.* Suponha que queiramos isolar a proteína expressa por um gene específico. Os peptídios que correspondem à tradução de parte da sequência nucleotídica do gene podem ser sintetizados, e anticorpos que reconhecem estes peptídios, produzidos. Estes anticorpos podem então ser usados para isolar a proteína intacta ou para localizá-la dentro da célula.

2. *Peptídios sintéticos podem ser usados para isolar receptores de muitos hormônios e outras moléculas de sinalização*. Por exemplo, células brancas sanguíneas são atraídas pelas bactérias por meio dos peptídios de formil-metionil (fMet) liberados na degradação de proteínas bacterianas. Peptídios sintéticos de formil-metionil têm sido úteis na identificação destes receptores de superfície celular da linhagem branca de células sanguíneas. Além disso, os peptídios sintéticos podem ser ligados aos grãos de agarose para preparar colunas de afinidade cromatográficas para a purificação de proteínas receptoras que reconheçam especificamente tais peptídios.



Peptídio fMet

3. Peptídios sintéticos podem servir como medicamentos. A vasopressina é um hormônio peptídico que estimula a reabsorção de água nos túbulos distais dos rins, levando à formação de urina mais concentrada. Pacientes com diabetes insípido têm deficiência de vasopressina (também conhecida como *hormônio antidiurético*), e portanto excretam grandes quantidades de urina diluída (mais de 5 l ao dia) e estão continuamente sedentos. Esta patologia pode ser tratada por meio da administração de 1-desamino-8-D-arginina vasopressina (desmopressina), um análogo sintético do hormônio carencial (Figura 3.38). Este peptídio sintético é degradado *in vivo* muito mais lentamente que a vasopressina e não aumenta a pressão sanguínea.

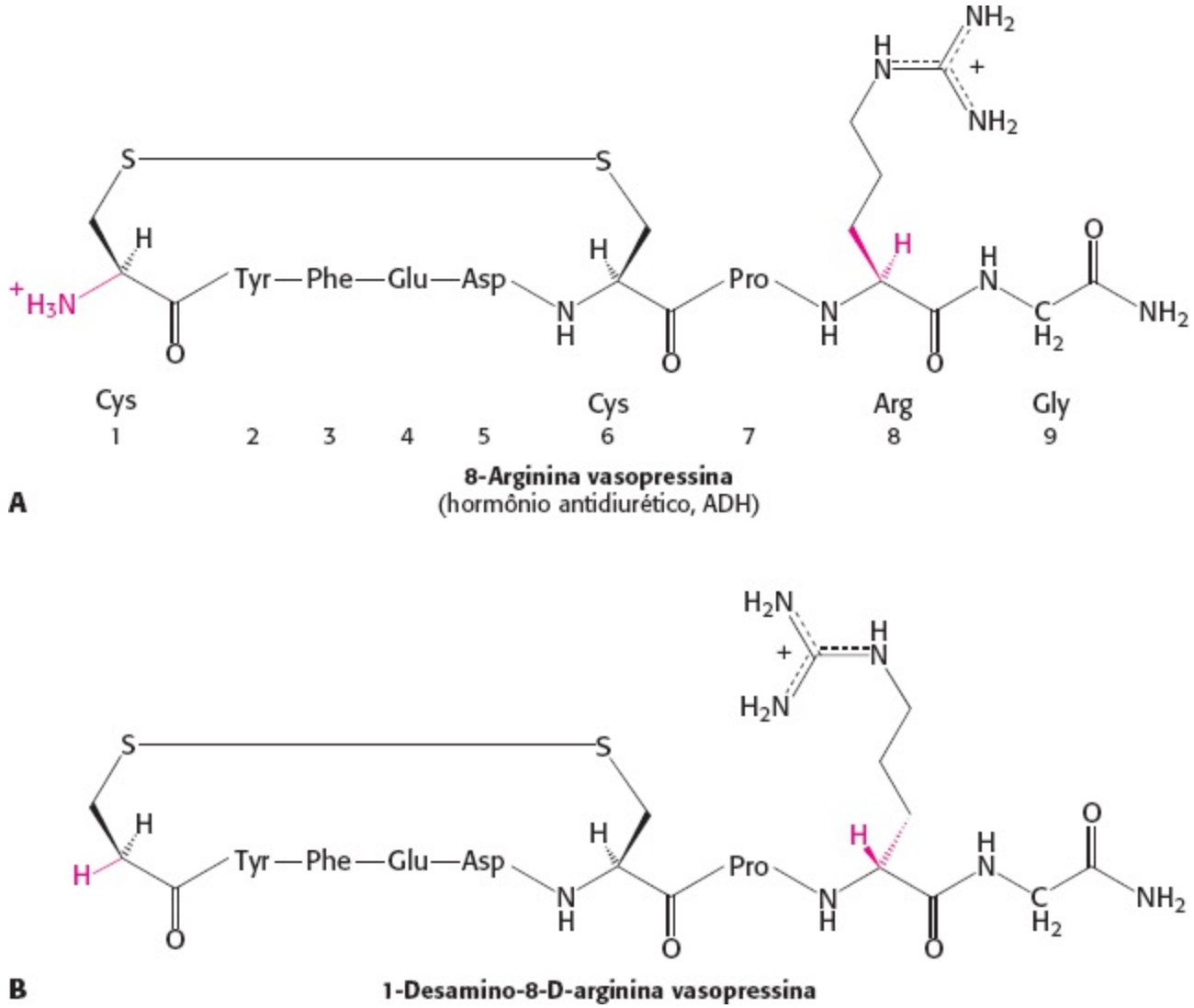
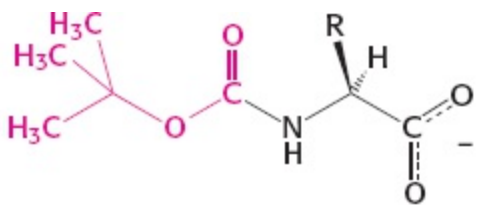
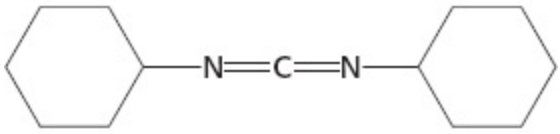


Figura 3.38 Vasopressina e seu análogo sintético. Fórmulas estruturais da (A) vasopressina, um hormônio peptídico que estimula a reabsorção de água e (B) 1-desamino-8-D-arginina vasopressina, um análogo sintético mais estável deste hormônio antidiurético.

4. Finalmente, *o estudo de peptídios sintéticos pode auxiliar na definição das regras que governam a estrutura tridimensional das proteínas.* Podemos perguntar se uma sequência em particular tende a dobrar-se em uma α-hélice, uma fita β ou uma volta reversa, ou se comporta como uma mola aleatória. Os peptídios criados para tais estudos podem incorporar aminoácidos que normalmente não são encontrados nas proteínas, permitindo mais variações na estrutura química do que é possível com o uso de apenas 20 aminoácidos.



Aminoácido *t*-butiloxicarbonil (*t*-Boc)



Diciclo-hexilcarbodiimida (DCC)

Como estes peptídios são construídos? O grupo amino de um aminoácido é ligado ao grupo carboxil do outro. No entanto, um produto único é feito apenas se um único grupo amino e um único grupo carboxil estão disponíveis para a reação. Deste modo, é necessário bloquear alguns grupos e ativar outros de forma a prevenir reações indesejáveis. Primeiramente o carboxiterminal de um aminoácido é ligado a uma resina insolúvel, efetivamente protegendo o carboxiterminal de outras ligações peptídicas (Figura 3.39). O grupo α amino deste aminoácido é bloqueado com um grupo protetor como o grupo *tert*-butiloxicarbonil (*t*-Boc). O grupo protetor *t*-Boc deste aminoácido é então removido com ácido trifluoroacético.

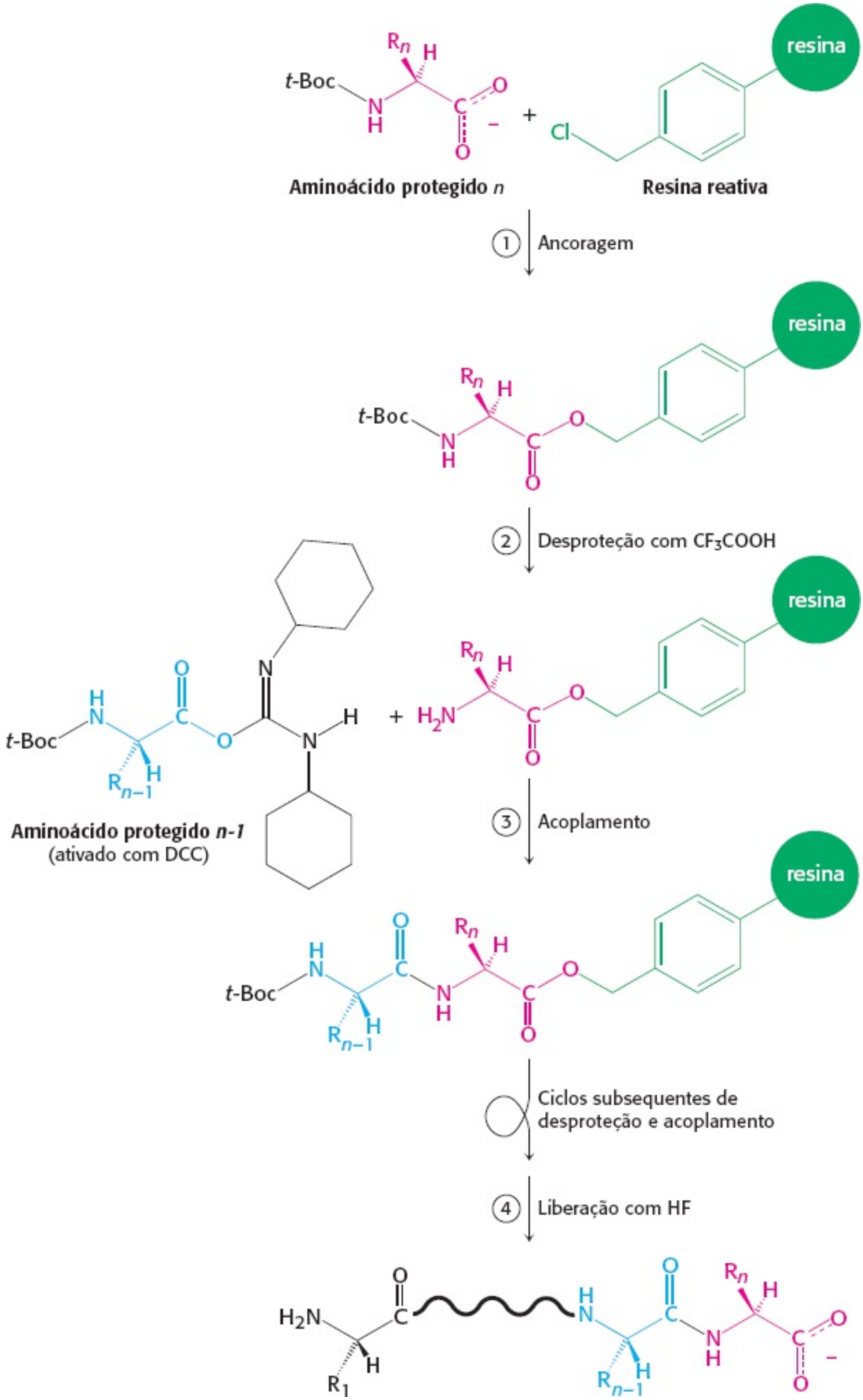


Figura 3.39 Síntese de peptídios em fase sólida. A sequência de etapas na síntese de fase sólida é: (1) ancoragem do aminoácido C-terminal a uma resina sólida, (2) desproteção do terminal amino, e (3) acoplamento do terminal amino livre

com o grupo carboxil ativado por DCC do próximo aminoácido. As etapas 2 e 3 são repetidas para cada aminoácido adicionado. Finalmente, na etapa 4, o peptídio completo é liberado da resina.

O próximo aminoácido (na forma protegida *t*-Boc) e *diciclo-hexilcarbodiimida* (DCC) são adicionados em conjunto. Nesta etapa, apenas o grupo carboxil do aminoácido adicionado e o grupo amino do aminoácido ligado à resina estão livres para formar uma ligação peptídica. O DCC reage com o grupo carboxil do aminoácido adicionado, ativando-o para a reação da formação de ligação peptídica. Após a formação da ligação peptídica, os reagentes em excesso e a diciclo-hexilureia são lavados, deixando apenas o produto dipeptídico desejado ligado à resina. Aminoácidos adicionais são ligados pela mesma sequência de reações. Ao final da síntese, o peptídio é liberado da resina por meio da adição de ácido fluorídrico (HF), que cliva a âncora de éster carboxílico sem quebrar as ligações peptídicas. Os grupos protetores de cadeias laterais potencialmente reativas, como os da lisina, também são removidos nesta etapa.

A principal vantagem deste *método em fase sólida*, inicialmente desenvolvido por R. Bruce Merrifield, é que o produto desejado em cada estágio é ligado a uma resina que pode ser rapidamente filtrada e lavada, de forma que não há necessidade da purificação de intermediários. Todas as reações ocorrem em um aparato único, eliminando as perdas devidas às transferências repetitivas de produtos. Este ciclo de reações pode ser prontamente automatizado, o que torna viável a síntese rotineira de peptídios contendo cerca de 50 resíduos com um bom rendimento e pureza. De fato, o método em fase sólida foi usado para sintetizar interferons (155 resíduos), que têm atividade antiviral, e a ribonuclease (124 resíduos), que é cataliticamente ativa. Os grupos protetores e os agentes de clivagem podem ser variados para aumentar a flexibilidade e a conveniência do processo.

Os peptídios sintéticos podem ser ligados para criar moléculas ainda maiores. Com o uso de métodos *de ligação de peptídios* especialmente desenvolvidos, proteínas de 100 aminoácidos ou mais podem ser sintetizadas em forma bem pura. Estes métodos permitem a construção de ferramentas ainda mais precisas para o exame da estrutura e função das proteínas.

3.6 A estrutura tridimensional das proteínas pode ser determinada por cristalografia de raios X e espectroscopia de ressonância magnética

A elucidação da estrutura tridimensional de uma proteína é geralmente uma fonte de grandes ideias sobre a sua função, uma vez que a especificidade de seus sítios ativos e de sítios de ligação é definida pelo preciso arranjo atômico destas regiões. Por exemplo, o conhecimento da estrutura de uma proteína permite que o bioquímico antecipe seu mecanismo de ação, os efeitos de mutações sobre sua função e as características desejáveis de medicamentos que possam inibir ou aumentar sua atividade. A cristalografia de raios X e a espectroscopia por ressonância magnética são duas das técnicas mais importantes para a elucidação da conformação das proteínas.

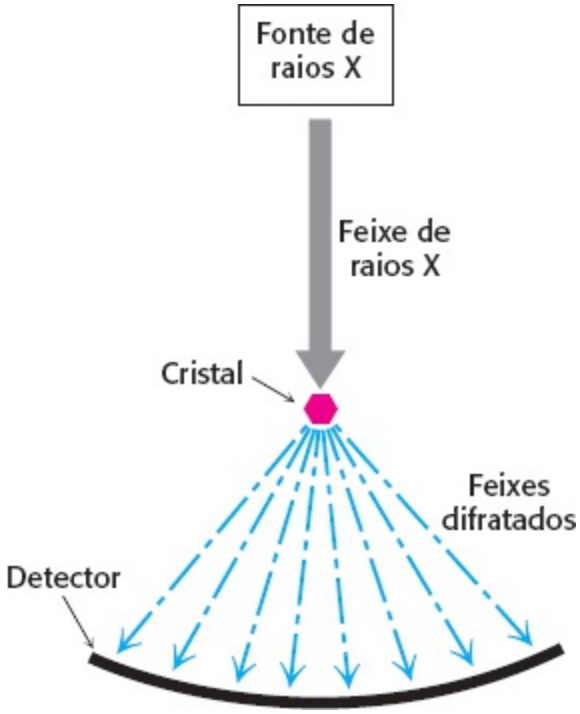


Figura 3.40 Experimento de cristalografia de raios X. Uma fonte de raios X gera um feixe, que é difratado por um cristal. O padrão de difração resultante é coletado por um detector.

A cristalografia de raios X revela a estrutura tridimensional em detalhes atômicos

A cristalografia de raios X foi o primeiro método desenvolvido para determinar a estrutura proteica em detalhe atômico. Esta técnica fornece a visualização mais clara das posições tridimensionais precisas da maioria dos átomos de uma proteína. De todas as formas de radiação, os raios X fornecem a melhor resolução para a determinação das estruturas moleculares porque seu comprimento de onda corresponde, aproximadamente, ao da ligação covalente. Os três componentes em uma análise cristalográfica com raios X são um *cristal de proteína, uma fonte de raios X* e um *detector* (Figura 3.40).

A cristalografia de raios X primeiramente exige a preparação de uma proteína ou complexo proteico em forma de cristal, na qual todas as moléculas de proteínas estão orientadas de forma fixa e repetitiva entre si. A adição lenta de sulfato de amônio ou outro sal a uma solução concentrada de proteína reduz sua solubilidade e favorece a formação de cristais altamente ordenados – o processo de *salting out* discutido na página 70. Por exemplo, a mioglobina cristaliza-se em 3 M de sulfato de amônio. A cristalização de uma proteína pode ser bem desafiante: uma solução de material de alta pureza é necessária e é geralmente difícil prever quais condições experimentais fornecerão os cristais mais efetivos. Foram desenvolvidos métodos para a varredura de várias condições de cristalização diferentes, utilizando-se pequenas quantidades de proteína. Tipicamente, centenas de condições devem ser testadas para obter cristais completamente adequados para os estudos cristalográficos. No entanto, proteínas cada vez maiores e complexas têm sido cristalizadas. Por exemplo, o poliovírus, um conjunto de 8.500 kDa de 240 subunidades de proteínas que circundam um cerne de RNA, foi cristalizado e sua estrutura foi descoberta por métodos com raios X. De maneira crucial, as proteínas frequentemente se cristalizam em suas configurações ativas. Os cristais de enzimas podem exibir atividades catalíticas, se os cristais são infundidos com o substrato.

Após a obtenção de um cristal de proteína adequadamente puro, uma fonte de raios X é necessária. Um feixe de raios X de comprimento de onda de 1,54 Å é produzido por meio da aceleração de

elétrons contra um alvo de cobre. O equipamento adequado para a geração de raios X desta forma está disponível em muitos laboratórios. Alternativamente, os raios X podem ser produzidos por *radiação síncrotron*, a aceleração de elétrons em órbitas circulares a velocidades próximas à da luz. Os feixes de raios X gerados por radiação síncrotron são muito mais intensos que aqueles gerados pelos elétrons atingindo o cobre. Diversas instalações pelo mundo geram radiação síncrotron, como o Advanced Light Source do Argonne National Laboratory, próximo de Chicago, e o Photon Factory, na cidade de Tsukuba, no Japão.

Quando um feixe estreito de raios X é dirigido ao cristal de proteína, a maior parte do feixe passa diretamente através do cristal, enquanto uma pequena parte é dispersa em várias direções. Estes raios X dispersos, ou *difratados*, podem ser detectados por filmes de raios X ou por um detector eletrônico de estado sólido. O padrão de dispersão fornece grande quantidade de informação sobre a estrutura da proteína. Os princípios físicos básicos subjacentes a esta técnica são:

1. *Os elétrons dispersam os raios X.* A amplitude da onda dispersada por um átomo é proporcional ao seu número de elétrons. Assim, um átomo de carbono dispersa seis vezes mais do que um átomo de hidrogênio.

2. *As ondas dispersas recombinam.* Cada feixe difratado consiste em ondas dispersas por cada átomo no cristal. As ondas dispersas reforçam uma a outra no filme ou detector de raios X se estiverem em fase (em compasso), e cancelam uma a outra se estiverem fora de fase.

3. A forma na qual as ondas dispersas se recombinam dependem apenas do arranjo atômico.

Figura 3.41 Um padrão de difração de raios X. Uma precessão de raios X de um cristal de mioglobina. [Mel Pollinger/Fran Heyl Associates]

O cristal de proteína é montado e posicionado em uma orientação precisa relativa ao feixe de raios X e ao filme. O cristal é rotacionado de forma que o feixe possa atingi-lo em várias direções. Este movimento rotacional origina uma fotografia de raios X que consiste em um arranjo regular de pontos conhecido como *reflexos*. A fotografia de raios X mostrada na Figura 3.41 é uma seção bidimensional através de um arranjo tridimensional de 25.000 pontos. As intensidades e posições destes reflexos são os dados experimentais básicos de uma análise cristalográfica de raios X. Cada reflexo é formado por uma onda com uma amplitude proporcional à raiz quadrada da intensidade

observada do ponto. Cada onda tem também a sua *fase* – ou seja, o intervalo entre seus picos e vales relativos às demais ondas. Devem ser realizados experimentos ou cálculos adicionais para determinar as ondas correspondentes de cada reflexo.

O próximo passo é reconstruir uma imagem da proteína a partir dos reflexos observados. Na microscopia óptica ou na microscopia eletrônica, os feixes difratados são focados utilizando-se lentes para formar diretamente uma imagem. No entanto, não existem lentes apropriadas para o foco dos raios X. Em vez disso, a imagem é formada aplicando-se relações matemáticas chamadas de *transformada de Fourier* às amplitudes medidas e fases calculadas de cada reflexo observado. A imagem obtida é referida como o *mapa de densidade eletrônica.* É uma representação gráfica tridimensional em que os elétrons são mais densamente localizados e é utilizada para determinar as posições dos átomos da molécula cristalizada (Figura 3.42). Importante para a interpretação do mapa é a sua *resolução*, que é determinada pelo número de intensidades dispersas usadas na transformada de Fourier. A fidelidade da imagem depende de sua resolução, como mostrado na analogia óptica na Figura 3.43. Uma resolução de 6 Å revela o curso de uma cadeia polipeptídica, mas poucos outros detalhes estruturais. A razão é que as cadeias polipeptídicas se unem de modo que seus centros ficam entre 5 Å e 10 Å distantes. Mapas em resoluções maiores são necessários para delinear grupos de átomos, que estão entre 2,8 Å e 4,0 Å distantes. A resolução final de uma análise de raios X é determinada pelo grau de perfeição de um cristal. Para as proteínas, a resolução limitante é, em geral, de aproximadamente 2 Å.

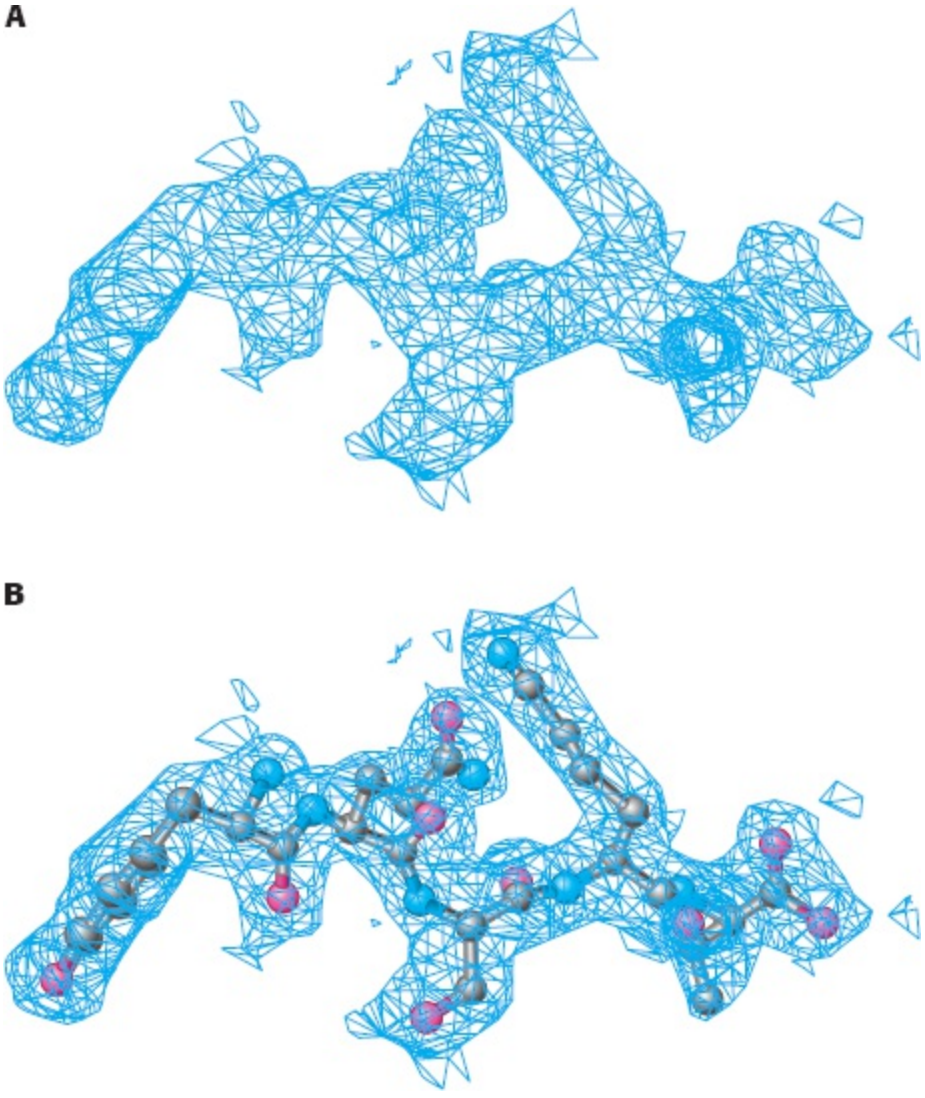


Figura 3.42 Interpretação de um mapa de densidade eletrônica. **A.** Um segmento de um mapa de densidade eletrônica é desenhado como um diagrama de contorno tridimensional, no qual as regiões dentro da "jaula" representam as regiões de maior densidade eletrônica. **B.** Um modelo da proteína é construído neste mapa de forma a maximizar a localização dos átomos nesta densidade. [Desenhada a partir de 1FHC.pdb.]

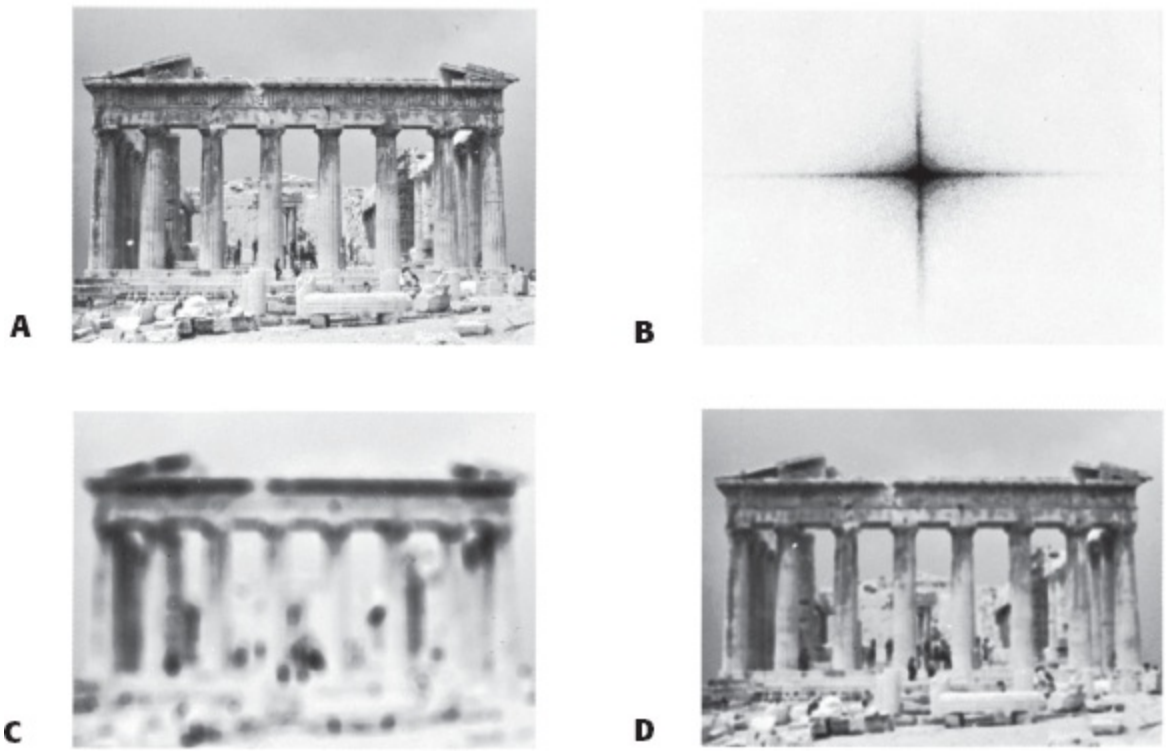


Figura 3.43 A resolução afeta a qualidade de uma imagem. O efeito da resolução sobre a qualidade de uma imagem reconstruída é mostrada por uma analogia óptica da difração de raios X: **A.** uma fotografia do Partenon; **B.** um padrão de difração óptica do Partenon; **C e D.** imagens reconstruídas a partir do padrão em B. Mais dados foram usados para obter a imagem D do que a C, o que explica a melhor qualidade da imagem D. [Cortesia do Dr. Thomas Steitz (parte A) e Dr. David DeRosier (parte B).]

A espectroscopia por ressonância magnética pode revelar a estrutura de proteínas em solução

A cristalografia de raios X é o método mais poderoso para a determinação da estrutura proteica. No entanto, algumas proteínas não cristalizam prontamente. Além disso, embora as estruturas presentes nas proteínas cristalizadas representem muito bem as proteínas livres das limitações impostas pelo ambiente cristalino, as estruturas em solução podem incitar novas ideias. *A espectroscopia por ressonância magnética* é exclusiva na sua capacidade de revelar a estrutura atômica de moléculas *em solução*, desde que soluções altamente concentradas possam ser obtidas (~1 mM ou 15 mg ml^{-1} para um proteína de 15 kDa). Esta técnica baseia-se no fato de que certos núcleos atômicos são intrinsecamente magnéticos. Apenas um número limitado de isótopos exibem esta propriedade, chamada de *spin* (rotação); aqueles mais importantes para a bioquímica estão listados na Tabela 3.4. O exemplo mais simples é o núcleo do hidrogênio (^1H), que é um próton. A rotação de um próton gera um momento magnético. Este momento pode adquirir uma de duas orientações, ou estados de spin (chamados de α e β), quando um campo magnético externo é aplicado (Figura 3.44). A diferença de energia entre estes dois estados é proporcional à força imposta pelo campo magnético. O estado α tem uma energia ligeiramente menor porque ele está alinhado com o campo aplicado. De fato, em uma dada população de núcleos, uma quantidade um pouco maior terá o estado α (por um fator da

ordem de 1.00001 em um experimento típico). Um próton em rotação em um estado α pode ser elevado a um estado excitado (estado β) por meio da aplicação de um pulso de radiação eletromagnética (um pulso de radiofrequência, ou RF), desde que a frequência corresponda à diferença de energia entre os estados α e β. Nestas circunstâncias, o estado mudará de α para β; em outras palavras, a ressonância será obtida.

Tabela 3.4 Núcleos biologicamente relevantes que fornecem sinais RM.

Núcleo	Abundância natural (% em peso do elemento)
^{1}H	99,984
^{2}H	0,016
^{13}C	1,108
^{14}N	99,635
^{15}N	0,365
^{17}O	0,037
^{23}Na	100,0
^{25}Mg	10,05
^{31}P	100,0
^{35}Cl	75,4
^{39}K	93,1

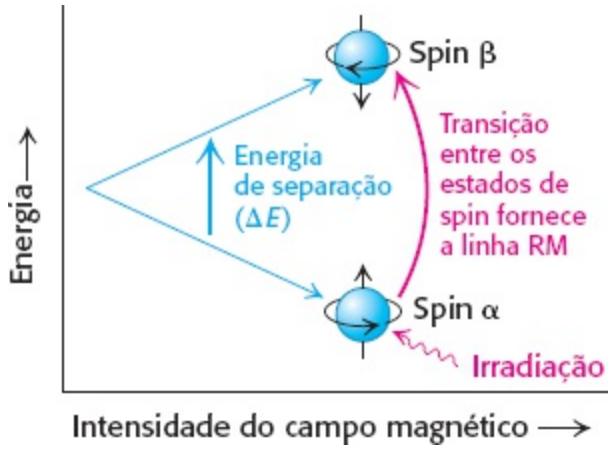


Figura 3.44 Bases da espectroscopia por RM. As energias das duas orientações de um núcleo de spin ½ (como ^{31}P e ^{1}H) dependem da força do campo magnético aplicado. A absorção da radiação eletromagnética de frequência apropriada induz uma transição do nível menor para o maior.

Estas propriedades podem ser utilizadas para examinar o ambiente químico do núcleo de hidrogênio. O fluxo de elétrons em torno de um núcleo magnético gera um pequeno campo magnético

local que se opõe ao campo aplicado. O grau desta oposição depende da densidade eletrônica do ambiente. Consequentemente, os núcleos em ambientes diferentes mudarão seus estados, ou ressonarão, com forças de campo, ou frequências de radiação, ligeiramente diferentes. Um espectro de ressonância para uma molécula é obtido por meio da manutenção do campo magnético constante e variando-se a frequência da radiação eletromagnética. O núcleo da amostra perturbada absorve a radiação eletromagnética em um frequência que pode ser medida. As frequências diferentes, chamadas de *deslocamentos químicos*, são expressas em unidades fracionárias δ (partes por milhão ou ppm) relativas aos deslocamentos de um composto padrão, como o derivado hidrossolúvel do tetrametilsilano, que é adicionado à amostra. Por exemplo, um próton CH_3 exibe tipicamente um deslocamento químico (δ) de 1 ppm, comparado com um deslocamento químico de 7 ppm de um próton aromático. Os deslocamentos químicos da maioria dos prótons nas moléculas de proteína variam de 0 a 9 ppm (Figura 3.45). A maioria dos prótons em muitas proteínas pode ser descoberta usando-se esta técnica de *RM unidimensional*. Com esta informação, podemos então deduzir as mudanças de um grupo químico em particular sob condições diferentes, como a mudança conformacional de uma proteína de uma estrutura desordenada a uma hélice α, em resposta à mudança de pH.

Podemos obter ainda mais informação por meio do exame sobre como os spins de diferentes prótons afetam seus vizinhos. Ao induzirmos uma magnetização temporária em uma amostra, pela aplicação de um pulso de radiofrequência, podemos alterar o spin de um núcleo e examinar o efeito no spin de um núcleo vizinho. Especialmente revelador é o *espectro bidimensional obtido pela espectroscopia nuclear aumentada de Overhauser* (NOESY, do inglês *nuclear Overhauser enhancement spectroscopy*), *que exibe graficamente pares de prótons que estão em íntima proximidade,* mesmo que eles não estejam juntos na estrutura primária. A base desta técnica é o *efeito nuclear Overhauser* (NOE, do inglês *nuclear Overhauser effect*), uma interação entre os núcleos, proporcional ao inverso da distância elevado à sexta potência. A magnetização é transferida de um núcleo excitado para um não excitado se os núcleos estiverem a menos de 5 Å um do outro (Figura 3.46). Em outras palavras, torna-se possível localizar os átomos em relação uns aos outros na estrutura tridimensional da proteína. Os picos que se localizam na diagonal do espectro NOESY (mostrado em branco na Figura 3.46B) correspondem àqueles presentes no experimento RM unidimensional. Os picos distantes da diagonal (mostrados em vermelho na Figura 3.46B), referidos como *picos fora da diagonal* ou *cross-peaks*, fornecem novas informações cruciais: *eles identificam pares de prótons que estejam a menos de 5* Å *um do outro*. Um espectro bidimensional NOESY para uma proteína com 55 aminoácidos é mostrado na Figura 3.47. O grande número de picos fora da diagonal revela pequenas distâncias próton-próton. A estrutura tridimensional da proteína pode ser reconstruída com o uso de tais relações de proximidade. As estruturas são calculadas de forma que os prótons que devem estar separados por menos de 5 Å com base no espectro NOESY estejam próximos uns dos outros na estrutura tridimensional (Figura 3.48). Se um número suficiente de restrições de distância for aplicado, a estrutura tridimensional pode praticamente ser determinada.

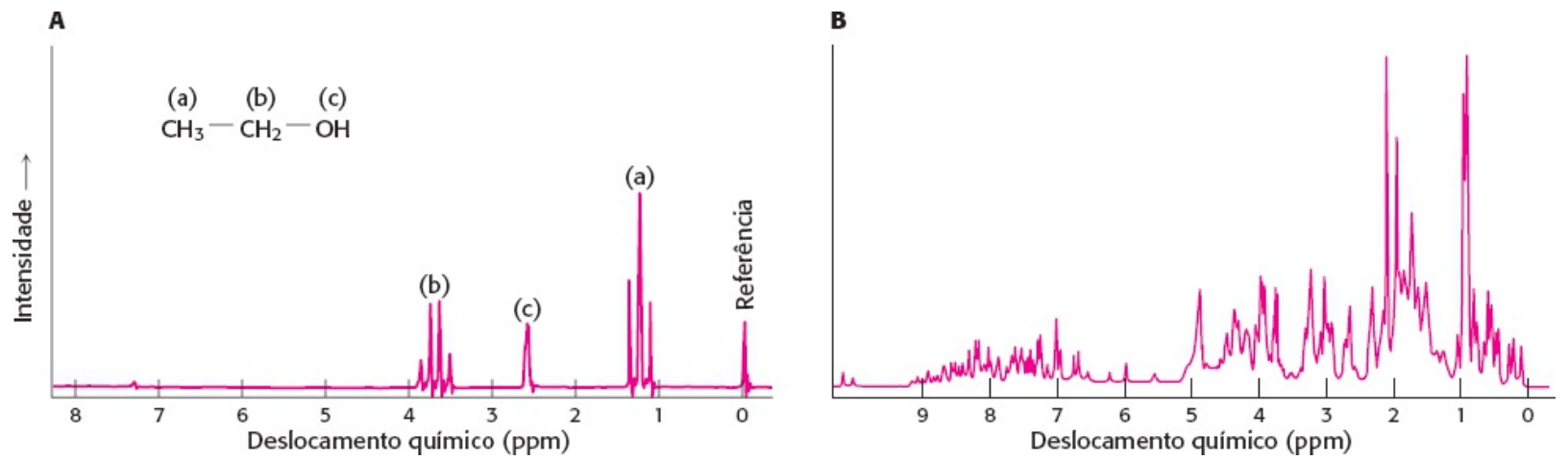


Figura 3.45 Espectro RM unidimensional. **A.** O espectro ^{1}H-RM do etanol (C_3CH_2OH) demonstra que os desvios químicos para o hidrogênio estão claramente resolvidos. **B.** Espectro ^{1}H-RM de um fragmento de 55 aminoácidos de uma proteína com um papel no *splicing* de RNA demonstra um alto grau de complexidade. Vários picos estão presentes com várias sobreposições. [(A) Segundo C. Branden e J. Tooze, *Introduction to Protein Structure* (Garland, 1991), p.280; (B) cortesia dos Drs. Barbara Amann e Wesley McDermott]

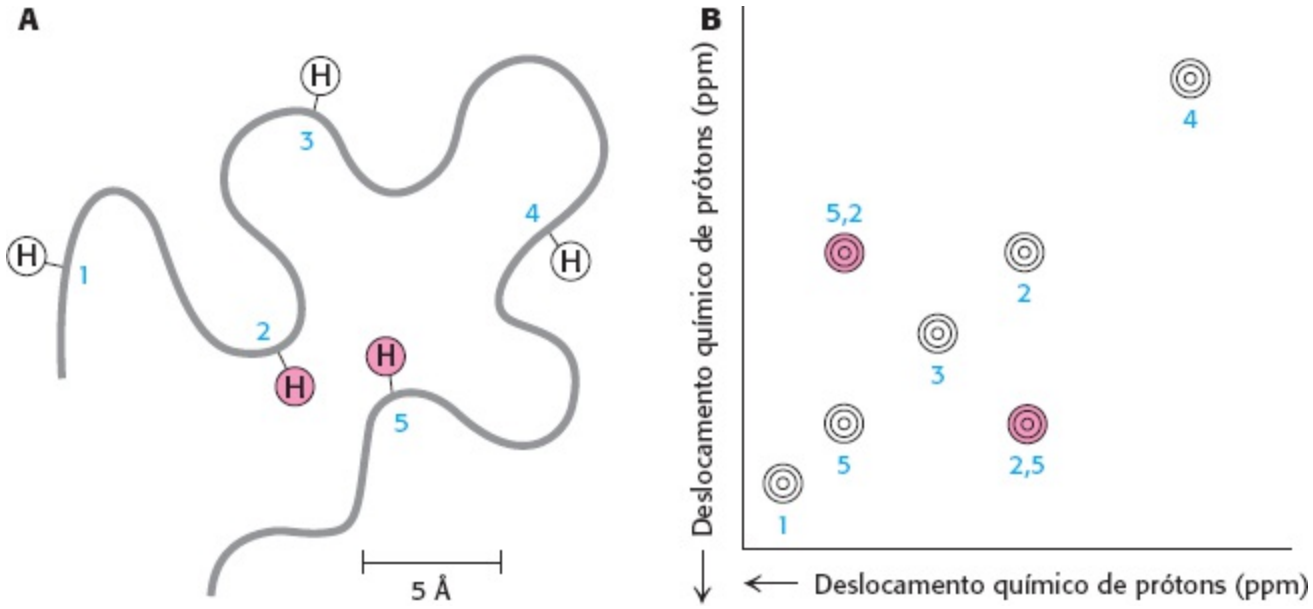


Figura 3.46 Efeito nuclear Overhauser. O efeito nuclear Overhauser (NOE) identifica pares de prótons que estão próximos. **A.** Representação esquemática de uma cadeia polipeptídica salientando cinco prótons em particular. Prótons 2 e 5 estão muito próximos (~4 Å), enquanto outros pares de prótons estão mais distantes. **B.** Um espectro NOESY bastante simplificado. A diagonal demonstra cinco picos correspondentes aos cinco prótons em A. O pico acima da diagonal e um pico simetricamente relacionado com este abaixo revela que o próton 2 está bem próximo do próton 5.

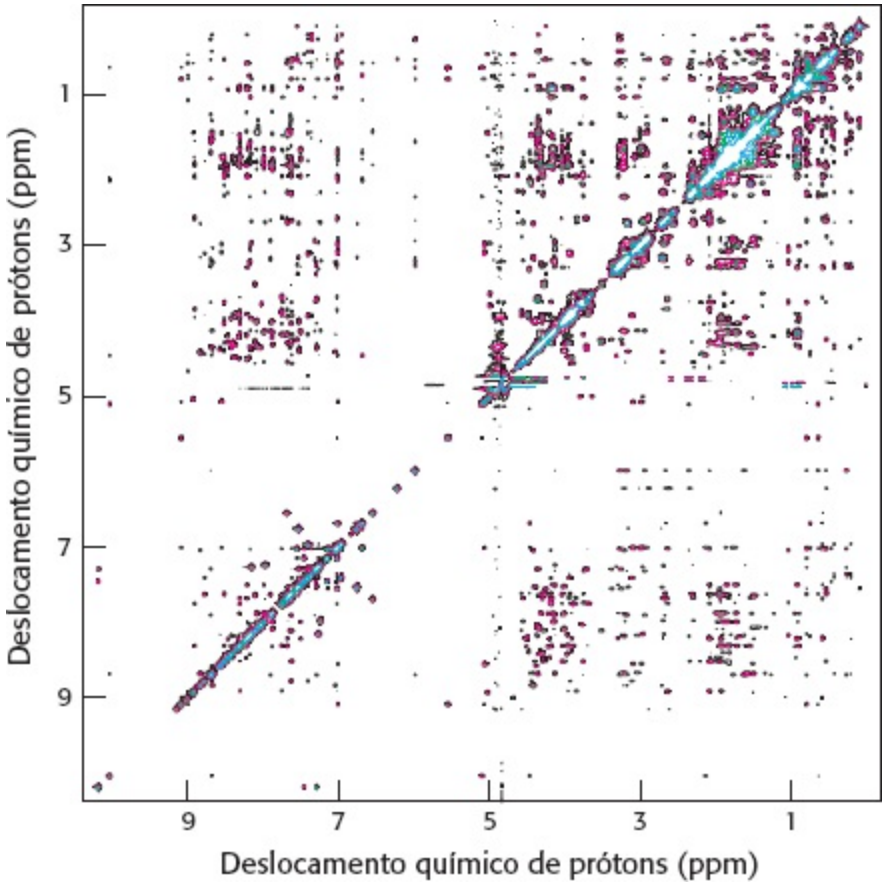


Figura 3.47 Detecção de distâncias curtas próton-próton. Um espectro NOESY para um domínio de 55 aminoácidos de uma proteína com um papel no *splicing* de RNA. Cada pico fora da diagonal corresponde a uma distância curta próton-próton, que pode ser utilizada para a determinação da estrutura tridimensional deste domínio. [Corteia dos Drs. Barbara Amann e Wesley McDermott.]

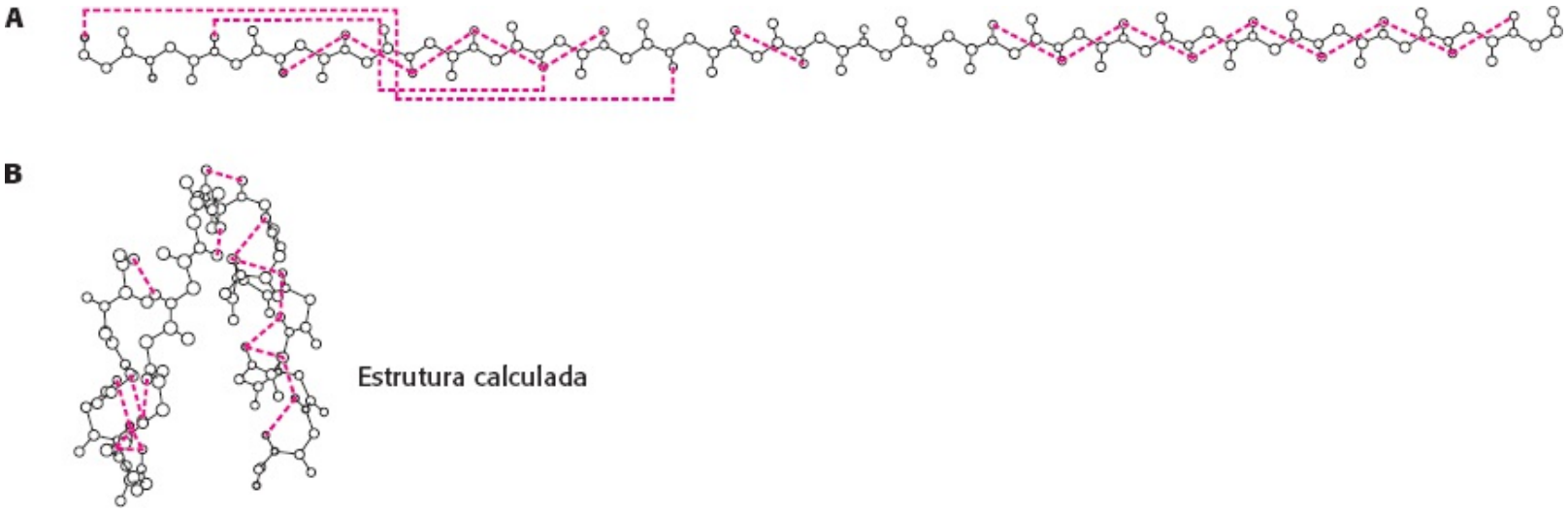


Figura 3.48 Estruturas calculadas com base nas restrições do RM. A. observações NOESY demonstram que prótons (conectados por linhas vermelhas pontilhadas) estão próximos uns aos outros no espaço. **B.** Uma estrutura tridimensional calculada com os pares de prótons restritos a se posicionarem próximos.

Na prática, uma família de estruturas relacionadas é gerada pela espectroscopia RM (Figura 3.49). Primeiramente, um número suficiente de restrições pode não ser experimentalmente acessível para especificar completamente a estrutura. Em segundo lugar, as distâncias obtidas pela análise do espectro NOESY são apenas aproximadas. Finalmente, as observações experimentais não são feitas em uma molécula apenas; são feitas em um grande número de moléculas em solução, que têm

estruturas ligeiramente diferentes a qualquer momento. Assim, a família de estruturas geradas pela análise RM indica a faixa de conformações para a proteína em solução. Atualmente, a espectroscopia RM pode determinar apenas as estruturas de proteínas relativamente pequenas (40 kDa), mas sua resolução certamente aumentará. O poder da RM aumentou muito pelo potencial da tecnologia do DNA recombinante em produzir proteínas marcadas de maneira uniforme ou em locais específicos com ^{13}C, ^{15}N e ^{2}H (Capítulo 5).

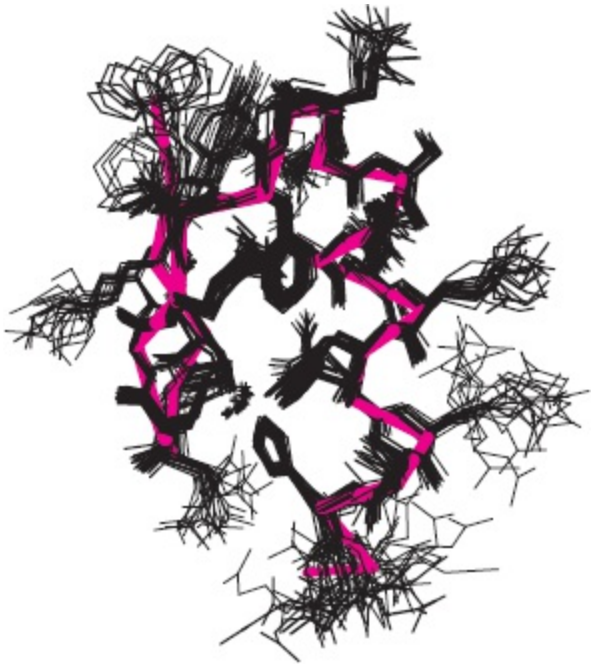


Figura 3.49 Uma família de estruturas. Um conjunto de 25 estruturas para um domínio de 28 aminoácidos de uma proteína dedo de zinco-ligante de DNA. A linha vermelha delineia o caminho médio do esqueleto da proteína. Cada uma destas estruturas é consistente com relação às restrições derivadas dos experimentos de RM. As diferenças entre as estruturas individuais são devidas a uma combinação de imperfeições dos dados experimentais e da natureza dinâmica das proteínas em solução. [Cortesia da Dra. Barbara Amann.]

As estruturas de cerca de 60.000 proteínas foram elucidadas pela cristalografia de raios X e pela espectroscopia RM até o fim de 2009, e muitas outras novas estruturas estão sendo determinadas todos os dias. As coordenadas são coletadas no Protein Data Bank (www.pdb.org), e as estruturas podem ser acessadas para visualização e análise. O conhecimento da arquitetura molecular detalhada das proteínas foi uma fonte de ideias sobre como as proteínas reconhecem e se ligam a outras moléculas, como funcionam como enzimas, como se enovelam e como evoluíram. Este êxito extraordinariamente rico está continuando a passos largos e influenciando muito todo o campo da bioquímica, assim como outras áreas da biologia e física.

Resumo

O rápido progresso no sequenciamento de genes avançou outro objetivo da bioquímica: a elucidação do proteoma. O proteoma é o conjunto completo de proteínas expressas e inclui informações sobre como elas são modificadas, como funcionam e como interagem com outras moléculas.

3.1 A purificação de proteínas é um primeiro passo essencial para a compreensão de suas funções

As proteínas podem ser separadas umas das outras e de outras moléculas de acordo com características como solubilidade, tamanho, carga e afinidade de ligação. A eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida separa as cadeias polipeptídicas das proteínas, sob condições de desnaturação, principalmente com base em suas massas. As proteínas também podem ser separadas eletroforeticamente com base em sua carga total por focalização isoelétrica em um gradiente de pH. A ultracentrifugação e a cromatografia de filtração em gel separam as proteínas principalmente de acordo com seu tamanho, enquanto a cromatografia de troca iônica as separa principalmente de acordo com sua carga total. A alta afinidade de várias proteínas por grupos químicos específicos é explorada na cromatografia por afinidade, na qual as proteínas se ligam a colunas contendo grãos covalentemente ligados a substratos, inibidores ou outros grupos especificamente reconhecidos. A massa de uma proteína pode ser determinada por medidas de sedimentação-equilíbrio.

3.2 As sequências de aminoácidos das proteínas podem ser determinadas experimentalmente

As sequências de aminoácidos são ricas em informações relativas às famílias de proteínas, suas relações evolutivas e as doenças produzidas por suas mutações. O conhecimento de uma sequência fornece pistas valiosas para sua conformação e função. A composição dos aminoácidos de uma proteína pode ser assegurada por meio da hidrólise da proteína em seus aminoácidos constituintes em 6 M de HCl a 110°C. Os aminoácidos podem ser separados por cromatografia de troca iônica e quantificados por suas reações com a ninhidrina ou fluorescamina. As sequências de aminoácidos podem ser determinadas pela degradação de Edman, que remove um aminoácido por vez, da terminação amino de um peptídio. Cadeias polipeptídicas mais longas podem ser quebradas em partes menores, para análise, por meio de clivagens específicas com reagentes como o brometo de cianogênio, que cliva ligações peptídica na extremidade carboxiterminal de resíduos de metionina, ou a enzima tripsina, que cliva a extremidade carboxiterminal de resíduos de lisina e arginina.

3.3 A imunologia fornece técnicas importantes para a investigação das proteínas

As proteínas podem ser detectadas e quantificadas por anticorpos altamente específicos; anticorpos monoclonais são especialmente úteis porque são homogêneos. Ensaios enzimáticos imunoabsorventes e *Western blot*s de gel de SDS-poliacrilamida são usados extensivamente. As proteínas também podem ser localizadas dentro das células por microscopia de imunofluorescência e microscopia imunoeletrônica.

3.4 A espectrometria de massa é uma poderosa técnica para a identificação dos peptídios e proteínas

Técnicas como a ionização/dessorção a *laser* assistida por matriz (MALDI) e a ionização por *electrospray* (ESI) permitem a geração de íons de proteínas e peptídios em fase gasosa. A massa de tais íons da proteína pode ser determinada com grande acurácia e precisão. As massas determinadas por estas técnicas atuam como marcas identificadoras das proteínas, porque a

massa de uma proteína ou peptídio é precisamente determinada por sua composição de aminoácidos e, deste modo, por sua sequência. Espectrometria de massa tandem é uma alternativa à degradação de Edman que permite um sequenciamento rápido e altamente acurado das proteínas. As técnicas de espectrometria de massa são centrais para a proteômica porque elas tornam possível a análise dos constituintes de grandes conjuntos macromoleculares ou outras coleções de proteínas.

3.5 Peptídios podem ser sintetizadas por métodos automatizados em fase sólida

Cadeias polipeptídicas podem ser sintetizadas por métodos automatizados em fase sólida, na qual a extremidade carboxiterminal da cadeia em crescimento é ligada a um suporte insolúvel. O grupo carboxila do aminoácido que chega é ativado por diciclo-hexilcarbodiimida e unido ao grupo amino da cadeia em crescimento. Os peptídios sintéticos podem servir como medicamentos e como antígenos para estimular a formação de anticorpos específicos. Eles podem também incitar ideias sobre a relação entre a sequência de aminoácidos e a conformação da proteína.

3.6 A estrutura tridimensional das proteínas pode ser determinada por cristalografia de raios X e espectroscopia de ressonância magnética

A cristalografia de raios X e a espectroscopia por ressonância magnética enriqueceram muito a nossa compreensão sobre como as proteínas se enovelam, reconhecem outras moléculas e catalisam reações químicas. A cristalografia de raios X é possível porque elétrons dispersam raios X. O padrão de difração produzido pode ser analisado e revelar a organização dos átomos de uma proteína. As estruturas tridimensionais de dezenas de milhares de proteínas são hoje conhecidas em detalhe atômico. A espectroscopia por ressonância magnética revela a estrutura e dinâmica das proteínas em solução. O deslocamento químico dos núcleos depende de suas vizinhanças. Além disso, os spins dos núcleos vizinhos interagem uns com os outros de maneira que fornecem uma informação estrutural definitiva. Esta informação pode ser usada para determinar as estruturas tridimensionais completas das proteínas.

Palavras-chave

analisador de massa por tempo de voo (TOF) (p. 94)
anticorpo (p. 86)
anticorpo monoclonal (p. 88)
anticorpo policlonal (p. 88)
antígeno (p. 87)
atividade específica (p. 69)
coeficiente de sedimentação (unidade Sverdberg, S) (p. 78)
cristalografia de raios X (p. 100)
cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (p. 73)
cromatografia de afinidade (p. 72)
cromatografia de filtração em gel (p. 71)
cromatografia de troca iônica (p. 72)
degradação de Edman (p. 83)
deslocamento químico (p. 103)

determinante antigênico (epitopo) (p. 87)
diálise (p. 71)
eletroforese bidimensional (p. 76)
eletroforese em gel (p. 73)
ensaio (p. 69)
ensaio enzimático imunoabsorvente (ELISA) (p. 90)
espectrometria de massa tandem (p. 95)
espectroscopia por ressonância magnética (RM) (p. 103)
fenil isotiocianato (p. 83)
focalização isoelétrica (p. 75)
homogenato (p. 69)
ionização por electrospray (ESI) (p. 93)
ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) (p. 93)
mapa de densidade eletrônica (p. 102)
microscopia de fluorescência (p. 92)
método em fase sólida (p. 100)
peptídios sobrepostos (p. 84)
ponto isoelétrico (p. 75)
proteoma (p. 68)
proteína fluorescente verde (GFP) (p. 92)
salting out (p. 70)
transformada de Fourier (p. 102)
troca de ânions (p. 72)
troca de cátions (p. 72)
Western blotting (p. 91)

Questões

1. *Reagentes valiosos.* Os seguintes reagentes são geralmente utilizados na química de proteínas:

CNBr	Tripsina	Ninhidrina
Ureia	Ácido perfórmico	Fenil isotiocianato
Mercaptoetanol	6 N HCl	Quimiotripsina

Qual deles é o mais adequado para executar cada uma das seguintes tarefas?

(a) Determinação da sequência de aminoácidos de um pequeno peptídio.

(b) Desnaturação reversível de uma proteína desprovida de pontes dissulfeto. Qual reagente adicional você precisaria se as pontes dissulfeto estivessem presentes?

(c) Hidrólise de ligações peptídicas na extremidade carboxiterminal de resíduos aromáticos.

(d) Clivagem de ligações peptídicas na extremidade carboxiterminal de metioninas.

(e) Hidrólise de ligações peptídicas na extremidade carboxiterminal de resíduos de lisina e arginina.

2. *Encontrando um fim.* A hidrazina anidra (H_2N-NH_2) tem sido usada para clivar ligações peptídicas em proteínas. Quais são os produtos da reação? Como esta técnica poderia ser usada para identificar o aminoácido carboxiterminal?

3. *Criando um novo ponto de quebra.* A etilenoimina reage com as cadeias laterais da cisteína em proteínas, para formar derivados *S*-aminoetila. As ligações peptídicas no carboxiterminal destes

resíduos modificados de cisteína são suscetíveis à hidrólise por tripsina. Por que?

4. *Espectrometria.* A absorbância A de uma solução é definida por

$$A = \log_{10}(I_0/I)$$

Em que I_0 é a intensidade da luz incidente e I é a intensidade da luz transmitida. A absorbância relaciona-se com o coeficiente molar de absorção (coeficiente de extinção) ε (em M^{-1} cm^{-1}), concentração c (em M) e comprimento de trajetória (em cm) por:

$$A = \varepsilon lc$$

O coeficiente de absorção da mioglobina a 580 nm é de 15.000 M^{-1} cm^{-1}. Qual é a absorbância de um solução de 1 mg ml^{-1} em uma trajetória de 1 cm? Qual percentual da luz incidente é transmitido por esta solução?

5. *Precipitação.* Suponha que você precipite uma proteína com 1 M $(NH_4)_2SO_4$ e queira reduzir a concentração de $(NH_4)_2SO_4$. Você pega 1 ml de sua amostra e a dialisa em 1.000 de tampão. Ao fim da diálise, qual a concentração de $(NH_4)_2SO_4$ na sua amostra? Como você poderia reduzir ainda mais a concentração de $(NH_4)_2SO_4$?

6. *Demais ou insuficiente.* Porque as proteínas precipitam em altas concentrações salinas? Embora muitas proteínas precipitem em altas concentrações salinas, algumas exigem sais para dissolver em água. Explique o motivo pelo qual algumas proteínas precisam de sais para dissolver.

7. *Movimento lento.* A tropomiosina, uma proteína muscular de 70 kDa, sedimenta-se mais lentamente que a hemoglobina (65 kDa). Seus coeficientes de sedimentação são 2,6 S e 4,31 S, respectivamente. Qual característica estrutura da tropomiosina é responsável por sua lenta sedimentação?

8. *Sedimentando esferas.* Qual é a dependência do coeficiente de sedimentação s para uma proteína esférica em sua massa? Quão mais rápido sedimenta uma proteína de 80 kDa do que uma de 40 kDa?

9. *Frequentemente usado em xampus.* O detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) desnatura as proteínas. Sugira como o SDS destrói a estrutura proteica.

10. *Estimativa de tamanho.* As mobilidades eletroforéticas relativas de uma proteína de 30 kDa e de uma proteína de 92 kDa usadas como padrões em um gel de SDS-poliacrilamida são de 0,80 e 0,41, respectivamente. Qual é a massa aparente de uma proteína que tem a mobilidade de 0,62 neste gel?

11. *Migração inesperada.* Algumas proteínas migram de maneira anômala em géis de SDS-PAGE. Por exemplo, o peso molecular determinado por um gel de SDS-PAGE é algumas vezes diferente do peso molecular determinado pela sequência de aminoácidos. Sugira uma explicação para esta discrepância.

12. *Separando células* A separação de células ativadas por fluorescência (FACS, do inglês *fluorescent-activated cell sorting*) é uma técnica poderosa para separar as células de acordo com o seu conteúdo de uma molécula em particular. Por exemplo, um anticorpo específico marcado com fluorescência para uma proteína de superfície, pode ser usado para detectar células que possuam tal molécula. Suponha que você queira isolar células que possuam um receptor que as permita detectar

produtos de degradação bacteriana. No entanto, você ainda não tem o anticorpo específico contra este receptor. Qual molécula marcada com fluorescência você prepararia para identificar tais células?

13. *Escolha de métodos.* (a) O octapeptídio AVGWRVKS foi digerido pela enzima tripsina. Qual método seria o mais apropriado para a separação dos produtos: cromatografia de troca iônica ou por filtração em gel? Explique. (b) Suponha que o peptídio foi digerido com quimiotripsina. Qual seria a melhor técnica de separação? Explique.

14. *Ferramentas poderosas.* Anticorpos monoclonais podem ser conjugados a um suporte insolúvel por métodos químicos. Explique como estes grãos ligados aos anticorpos podem ser explorados para a purificação de proteína.

15. *Desenvolvimento de ensaio.* Você deseja isolar uma enzima de sua fonte natural e precisa de um método para medir a sua atividade ao longo da purificação. No entanto, nem o substrato nem o produto da reação catalisada pela enzima podem ser detectados por espectroscopia. Você descobre que o produto da reação é altamente antigênico quando injetado em camundongos. Proponha uma estratégia para desenvolver um ensaio adequado para esta enzima.

16. *Produzindo mais enzima?* Ao longo da purificação de uma enzima, um pesquisador executa uma etapa de purificação que fornece um resultado de *aumento* da atividade total, maior que o valor presente no extrato bruto. Explique como a quantidade total de atividade pode aumentar.

17. *Dividir e conquistar.* A determinação da massa de uma proteína por espectrometria de massa geralmente não permite sua identificação individual entre possíveis proteínas de um proteoma completo, mas a determinação das massas de todos os fragmentos produzidos por digestão com tripsina quase sempre permite a identificação exclusiva. Explique.

18. *Conheça seus limites.* Quais aminoácidos são indistinguíveis em um sequenciamento de peptídios por espectrometria de massa em tandem, descrito anteriormente neste capítulo, e por quê?

19. *Problema de purificação de proteínas.* Complete a seguinte tabela:

Procedimento de purificação	Proteína total (mg)	Atividade total (unidades)	Atividade específica (unidades mg−1)	Nível de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	20.000	4.000.000		1	100
Precipitação com $(NH_4)_2SO_4$	5.000	3.000.000			
Cromatografia com DEAE-celulose	1.500	1.000.000			
Cromatografia de filtração em gel	500	750.000			
Cromatografia de afinidade	45	675.000			

20. *O desafio da flexibilidade.* A estrutura das proteínas que possuem domínios separados por

regiões de ligação flexíveis pode ser difícil de descobrir por métodos de cristalografia de raios X. Por que isto ocorre? Quais são as possíveis abordagens experimentais para contornar esta barreira?

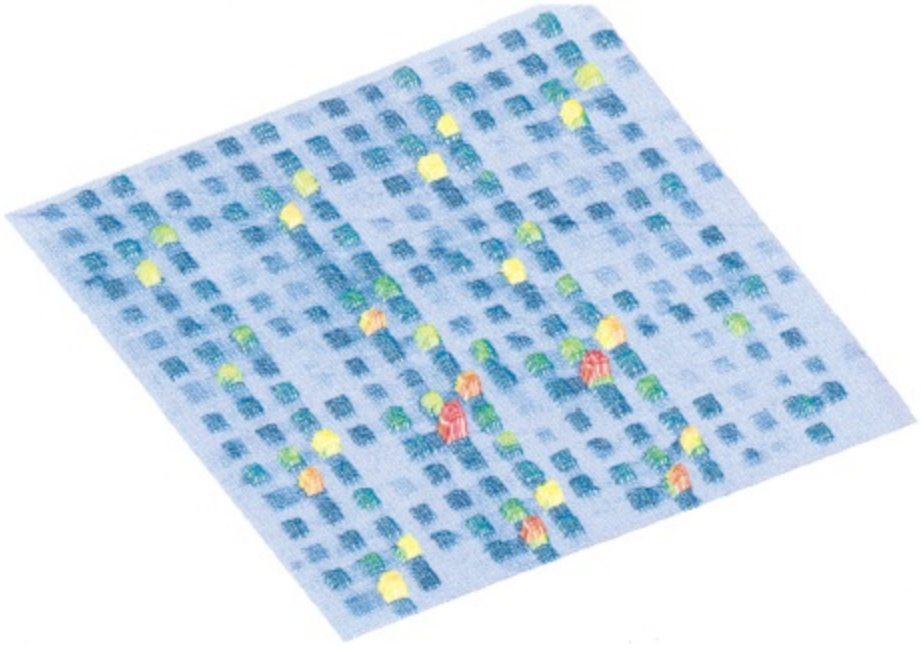
Questões | Integração de capítulos

21. *Estrutura quaternária.* Uma proteína foi purificada à homogeneidade. A determinação da massa por cromatografia por filtração em gel forneceu uma massa de 60 kDa. A cromatografia em presença de 6 M de ureia fornece uma espécie de 30 kDa. Quando a cromatografia é repetida com 6 M de ureia e 10 mM de β-mercaptoetanol, o resultado é de uma única espécie molecular de 15 kDa. Descreva a estrutura da molécula.

22. *Transições de hélice para molas.* (a) Medidas de RM mostraram que a poli-L-lisina é uma mola aleatória em pH 7, mas se torna uma hélice α quando o pH é aumentado acima de 10. Explique esta transição de conformação dependente de pH. (b) Prediga a dependência de pH da transformação de mola para hélice do poli-L-glutamato.

23. *Determinação de massa de peptídios.* Você isolou uma proteína da bactéria *E. coli* e busca confirmar sua identidade por digestão com tripsina e espectrometria de massa. A determinação de massa de muitos fragmentos de peptídios permitiu que você deduzisse a identidade da proteína. No entanto, há uma discrepância com um dos fragmentos de peptídio, que você acredita ter a sequência MLNSFK e um valor $(M + H)^+$ de 739,38. Em seus experimentos, você obtém repetitivamente um valor $(M + H)^+$ de 767,38. Qual é a causa desta discrepância e o que isso diz sobre a região da proteína da qual este peptídio é derivado?

24. *Peptídios em um chip.* Grandes números de diferentes peptídios podem ser sintetizados em uma pequena área em um suporte sólido. Este conjunto de alta densidade pode ser testado com uma proteína marcada com fluorescência para descobrir quais peptídios são reconhecidos. A ligação de um anticorpo a um conjunto de 1.024 peptídios diferentes ocupando uma área total da unha de um polegar é mostrado na ilustração anexa. Como você sintetizaria tal conjunto de peptídios? (Dica: use luz, em vez de ácido, para desproteger o grupo aminoterminal em cada etapa de síntese).



Triagem com fluorescência de um conjunto de 1.024 peptídios em uma área de 1,6 cm^2. Cada local de síntese é um quadrado de 400 μm. Um anticorpo monoclonal marcado com fluorescência foi adicionado ao conjunto para identificar os peptídios que são reconhecidos. A altura e a cor de cada quadrado denotam a intensidade da fluorescência. [Segundo S. P. A. Fodor *et al.*, *Science* 251 (1991):767.]

25. *Taxa de troca.* Os átomos amida dos hidrogênios das ligações peptídicas das proteínas podem se trocar com prótons no solvente. Em geral, os átomos de hidrogênio amida em regiões profundas das proteínas e complexos proteicos trocam mais lentamente do que aqueles em superfícies acessíveis ao solvente. A determinação destas taxas pode ser usada para explorar a reação de enovelamento de proteínas, sondar a estrutura terciária de proteínas e identificar as regiões de interface proteína-proteína. Estas reações de troca podem ser acompanhadas pelo estudo do comportamento da proteína em um solvente que foi marcado com deutério (^2H), um isótopo estável do hidrogênio. Quais os dois métodos descritos neste capítulo que poderiam ser rapidamente aplicados para o estudo da taxa de troca hidrogênio-deutério nas proteínas?

Questões | Interpretação de dados

26. *Sequenciamento de proteínas 1.* Determine a sequência do hexapeptídio com base nos seguintes dados. Nota: Quando a sequência não é conhecida, uma vírgula separa os aminoácidos. (Tabela 3.3).

Composição dos aminoácidos: (2R, A, S, V, Y)
Análise do N-terminal do hexapeptídio: A
Digestão por tripsina: (R, A, V) e (R, S, Y)
Digestão por carboxipeptidase: Não digere
Digestão por quimiotripsina: (A, R, V, Y) e (R, S)

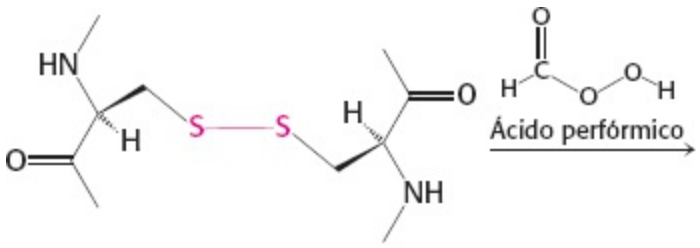
27. *Sequenciamento de proteínas 2.* Determine a sequência de um peptídio de 14 aminoácidos com base nos seguintes dados:

Composição dos aminoácidos: (4S, 2L, F, G, I, K, M, T, W, Y)
Análise do N-terminal: S
Digestão por carboxipeptidase: L
Digestão por tripsina: (3S, 2L, F, I, M, T, W) (G, K, S, Y)
Digestão por quimiotripsina: (F, I, S) (G, K, L) (L, S) (M, T) (S, W) (S, Y)
Análise do N-terminal do peptídio (F, I, S): S
Tratamento com brometo de cianogênio: (2S, F, G, I, K, L, M*, T, Y) (2S, L, W)
M*, metionina detectada como homosserina

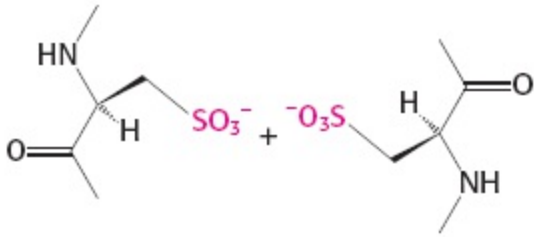
28. *Aplicações para a eletroforese bidimensional.* O ácido perfórmico cliva a ligação dissulfeto e converte os grupos sulfidrilas em resíduos de ácido cisteico, que não são mais capazes de formar pontes dissulfeto.

Considere o seguinte experimento: você suspeita que uma proteína que contém três resíduos de cisteína tenha uma única ponte dissulfeto. Você digere a proteína com tripsina e submete a mistura à eletroforese em uma extremidade de folha de papel. Após tratar o papel com ácido perfórmico, você submete a folha à eletroforese na direção perpendicular e a cora com ninidrina. Como apareceria o papel se a proteína não tivesse pontes dissulfeto? E se a proteína tivesse apenas uma ponte

dissulfeto? Proponha um experimento para identificar qual resíduo de cisteína forma a ponte dissulfeto.

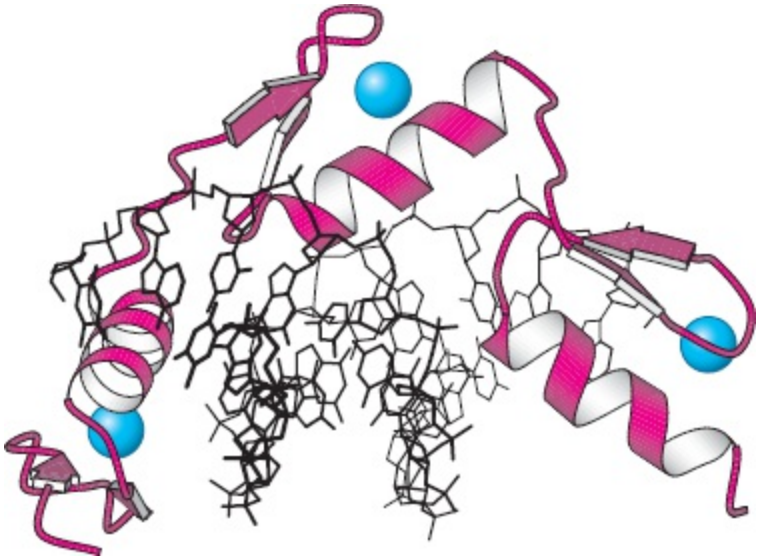


Cisteína



Ácido cisteico

DNA, RNA e Fluxo da Informação Genética



Ter genes em comum explica a semelhança entre uma mãe e suas filhas. Os genes devem ser expressos para provocar um efeito, e as proteínas regulam esta expressão. Uma destas proteínas regulatórias, a proteína “dedo de zinco” (o íon de zinco está em azul e a proteína, em vermelho) é mostrada ligada à região de controle do DNA (preto). [(Esquerda Barnaby Hall/Photonica. (Direita) Desenhada a partir de 1AAY.pdb.]

SUMÁRIO

4.1 Um ácido nucleico consiste em quatro tipos de bases ligadas a um arcabouço de ose-fosfato

4.2 Um par de cadeias de ácidos nucleicos com sequências complementares pode formar uma estrutura em dupla hélice

4.3 A dupla hélice facilita a transmissão precisa da informação hereditária

4.4 O DNA é replicado por polimerases que recebem instruções de moldes

4.5 A expressão gênica é a transformação da informação do DNA em moléculas funcionais

4.6 Os aminoácidos são codificados por grupos de três bases a partir de um ponto inicial fixo

4.7 A maioria dos genes eucarióticos é um mosaico de íntrons e éxons

O DNA e o RNA são longos polímeros lineares, chamados de ácidos nucleicos, que carregam a informação de uma maneira que pode ser passada de uma geração para a próxima. Estas macromoléculas consistem em um grande número de nucleotídios ligados, cada um composto de um açúcar (uma ose), um fosfato e uma base. As oses ligadas pelos fosfatos formam um arcabouço comum que tem um papel estrutural, enquanto *a sequência de bases ao longo da cadeia do ácido nucleico carrega a informação genética.* A molécula de DNA tem a forma de uma *dupla hélice,* uma estrutura helicoidal que consiste em duas fitas complementares de ácidos nucleicos. *Cada fita serve como um molde para a outra na replicação do DNA.* Os genes de todas as células e de muitos vírus são feitos de DNA.

Os genes especificam os tipos de proteínas que são feitas pelas células, mas o DNA não é o molde direto para a síntese de proteínas. Em vez disso, a fita de DNA é copiada em uma classe de molécula de RNA chamada de *RNA mensageiro* (mRNA), o intermediário portador da informação na síntese de proteínas. Este processo de *transcrição* é seguido pela *tradução*, a síntese de proteínas de acordo com as instruções dadas pelos moldes de mRNA. Assim, o fluxo da informação genética, ou a *expressão gênica,* nas células normais é

$$\text{DNA} \xrightarrow{\text{Transcrição}} \text{RNA} \xrightarrow{\text{Tradução}} \text{Proteína}$$

Este fluxo de informação depende do código genético, que define a relação entre a sequência de bases no DNA (ou seu transcrito de mRNA) e a sequência de aminoácidos na proteína. O código é aproximadamente o mesmo em todos os organismos: uma sequência de três bases, chamada de *códon,* especifica um aminoácido. Há outra etapa na expressão da maioria dos genes eucarióticos, os quais são mosaicos de sequências de ácidos nucleicos chamados de *íntrons* e *éxons*. Ambos são transcritos, mas antes que a tradução ocorra, os íntrons são excluídos das moléculas de RNA recém-sintetizadas, deixando moléculas de RNA maduras com éxons contínuos. A existência de íntrons e éxons tem implicações cruciais na evolução das proteínas.

4.1 Um ácido nucleico consiste em quatro tipos de bases ligadas a um arcabouço de ose-fosfato

Os ácidos nucleicos DNA e RNA são bem adequados à função de carreadores da informação genética em virtude de suas estruturas covalentes. Estas macromoléculas são *polímeros lineares*

constituídos por unidades similares conectadas extremidade a extremidade (Figura 4.1). Cada unidade monomérica dentro de um polímero é um *nucleotídio*. Um nucleotídio isolado consiste em três componentes: uma ose, um fosfato e uma de quatro bases. *A sequência das bases no polímero caracteriza exclusivamente um ácido nucleico e constitui uma forma de informação linear* – informação análoga às letras que soletram o nome de uma pessoa.

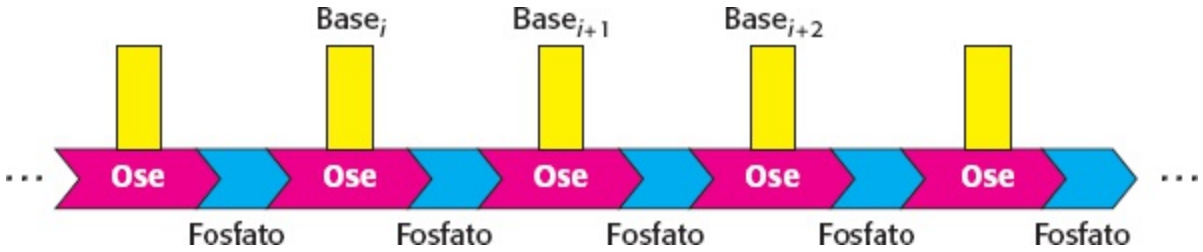


Figura 4.1 Estrutura polimérica dos ácidos nucleicos.

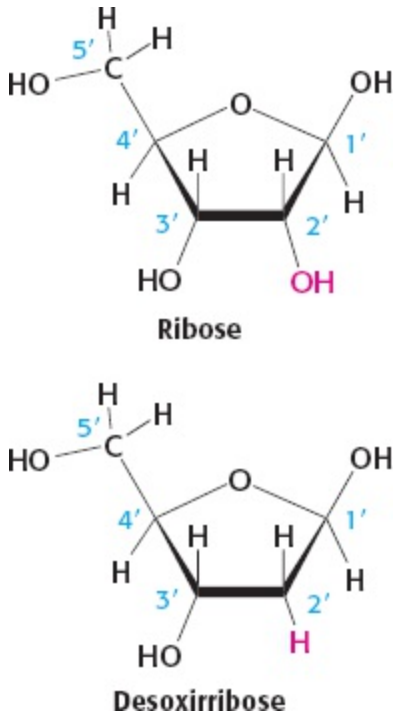


Figura 4.2 Ribose e desoxirribose. Os átomos nas unidades de ose são numerados com "linhas" para distingui-los dos átomos das bases (Figura 4.4).

O RNA e o DNA diferem na ose componente e em uma das bases

A ose no *ácido desoxirribonucleico* (DNA) é a *desoxirribose*. O prefixo desoxi indica que o átomo de carbono 2′ da ose não possui um átomo de oxigênio que é ligado ao átomo de carbono 2′ da *ribose*, como mostrado na Figura 4.2. Observe que os carbonos da ose são numerados com "linhas" para diferenciálos dos átomos das bases. As oses de ambos os ácidos nucleicos são ligados uns aos outros por pontes fosfodiéster. Especificamente, o grupo hidroxila 3′(3′-OH) da fração ose de um nucleotídio é esterificada a um grupo fosfato, que é, por sua vez, ligado ao grupo hidroxila 5′ da ose adjacente. A cadeia de oses ligadas por pontes fosfodiéster é referida como o arcabouço do ácido nucleico (Figura 4.3). Enquanto o arcabouço é constante em um ácido nucleico, as bases variam de um monômero ao outro. Duas das bases do DNA são derivadas da *purina* – adenina (A) e guanina (G) – e duas da *pirimidina* – citosina (C) e timina (T), como mostradas na Figura 4.4.

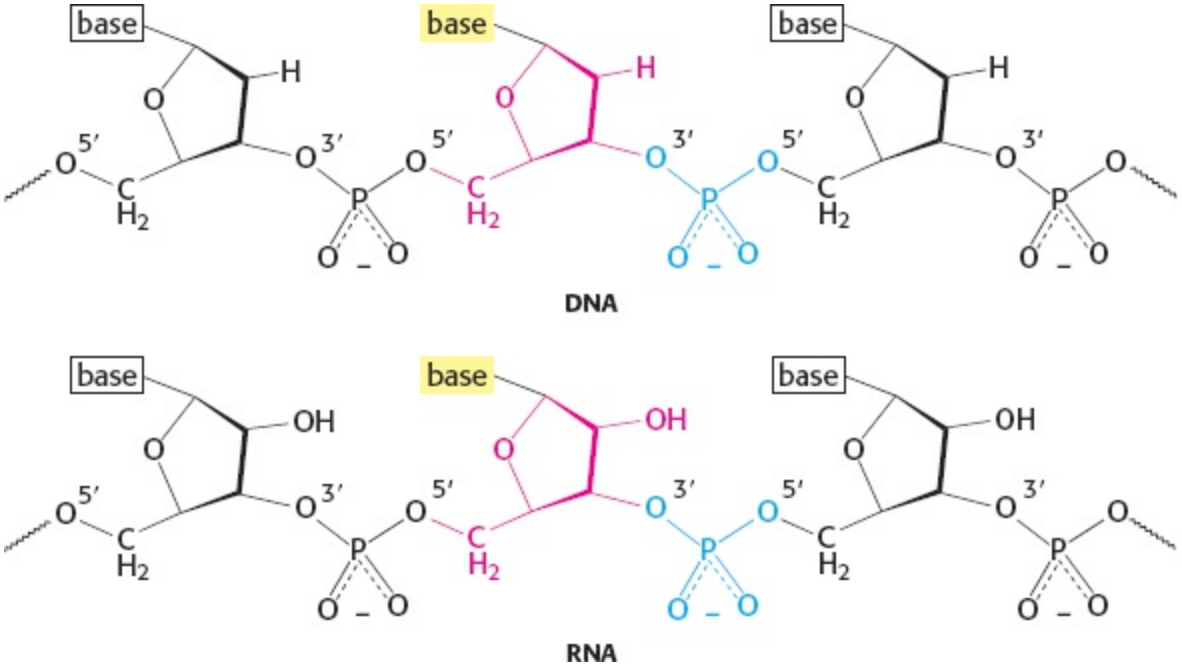


Figura 4.3 Arcabouços de DNA e RNA. Os arcabouços destes ácidos nucleicos são formados por ligações fosfodiéster 3′-5′. A unidade de ose está destacada em vermelho e o grupo fosfato, em azul.

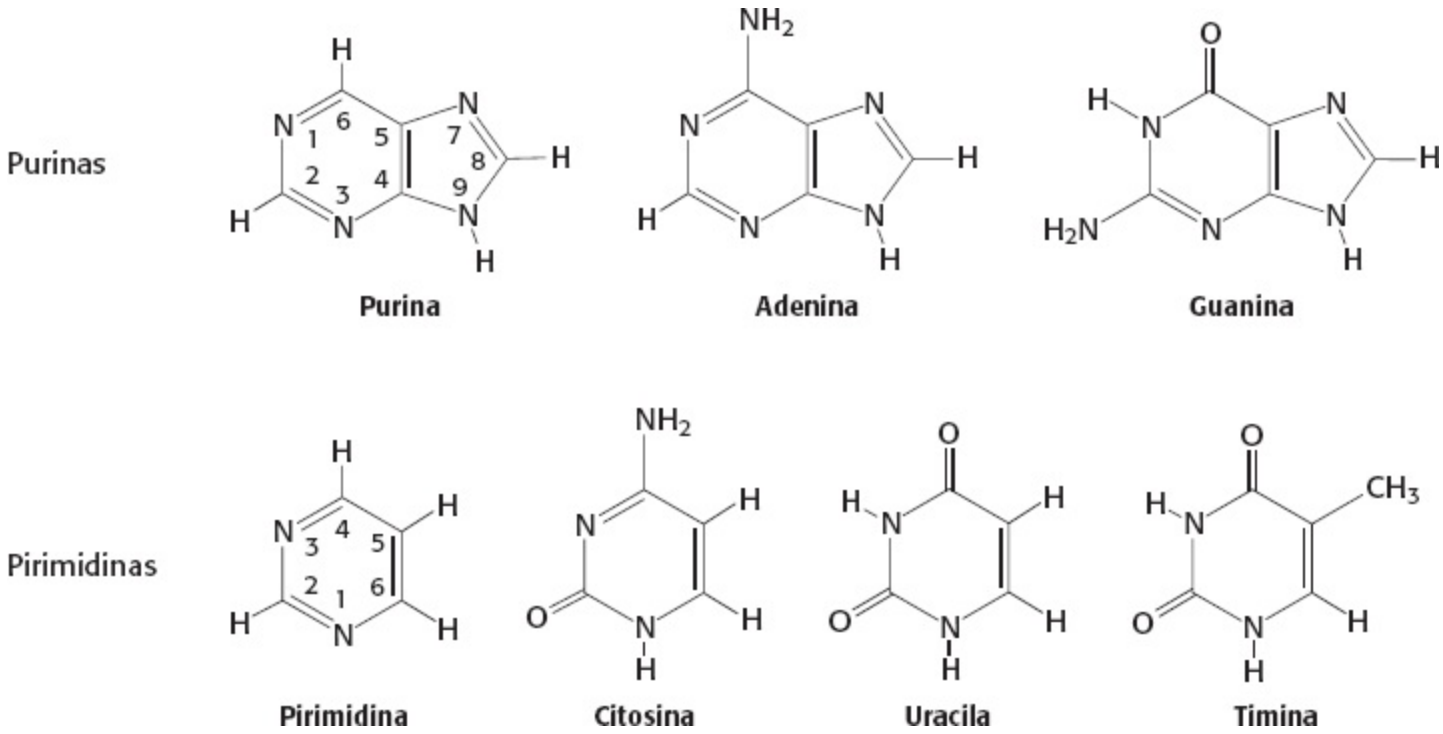


Figura 4.4 Purinas e pirimidinas. Os átomos das bases são numerados sem "linhas". A uracila está presente no RNA, em vez de timina.

O *ácido ribonucleico* (RNA), como o DNA, é um polímero longo não ramificado, consistindo em nucleotídios unidos por ligações fosfodiéster 3′-5′ (Figura 4.3). A estrutura covalente do RNA difere daquela do DNA por dois motivos. Primeiramente, as unidades de ose no RNA são riboses, e não desoxirriboses. A ribose contém um grupo hidroxila 2′ que não está presente na desoxirribose. Em segundo lugar, uma das principais bases do RNA é a uracila (U), em vez da timina (T).

Observe que cada ponte fosfodiéster tem uma carga negativa. Isso repele espécies nucleofílicas como os íons hidróxido; consequentemente, as ligações fosfodiéster são muito menos suscetíveis a ataques hidrolíticos que outros ésteres, como os ésteres de ácido carboxílico. Esta resistência é

crucial para a manutenção da integridade da informação armazenada nos ácidos nucleicos. A ausência do grupo hidroxila 2′ no DNA aumenta ainda mais sua resistência à hidrólise. A maior estabilidade do DNA provavelmente é responsável por seu uso, em vez do RNA, como material de transmissão de hereditariedade, em todas as células mais recentes e em muitos vírus.

Os nucleotídios são unidades monoméricas de ácidos nucleicos

Os blocos de construção dos ácidos nucleicos e os precursores destes blocos têm muitos outros papéis por toda a célula – por exemplo, como moeda energética e como sinais moleculares. Consequentemente, é importante estar familiarizado com a nomenclatura dos nucleotídios e seus precursores. Uma unidade consistindo em uma base ligada a um açúcar é conhecida como *nucleosídio*. As quatro unidades de nucleosídios no RNA são chamadas de *adenosina, guanosina, citidina* e *uridina*, enquanto aquelas no DNA são chamadas de *desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxicitidina e timidina*. Em cada base, o N-9 de uma purina ou o N-1 de uma pirimidina é ligado ao C-1′de uma ose por uma ligação *N*-glicosídica (Figura 4.5). Uma base localiza-se acima do plano da ose quando a estrutura está posta em orientação padrão; isto é, a configuração da ligação *N*-glicosídica é β (Seção 11.1).

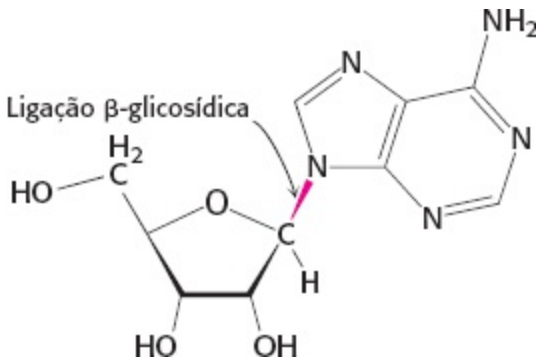


Figura 4.5 Ligação β-glicosídica em um nucleosídio.

Um *nucleotídio* é um nucleosídio ligado a um ou mais grupos fosforila por uma ligação éster. *Trifosfatos de nucleotídio, nucleosídios ligados a três grupos fosforila, são os monômeros – os blocos de construção – que são ligados para formarem o RNA e o DNA.* As quatro unidades de nucleotídio que se ligam para formar o DNA são monofosfatos de nucleotídio chamados de *desoxiadenilato, desoxiguanilato, desoxicitidilato* e *timidilato.* Observe que o timidilato contém desoxirribose; por convenção, este prefixo desoxi não é adicionado porque os nucleotídios que contêm timidina são apenas raramente encontrados no RNA. De maneira similar, os nucleotídios mais comuns que se ligam para formar o RNA são os monofosfatos de nucleotídios adenilato, guanilato, citidilato e uridilato.

Outra denotação de um nucleotídio é o nome da base com o sufixo “ato”. Esta nomenclatura não descreve o número de grupos fosforila ou o local de ligação ao carbono da ose. Uma nomenclatura mais precisa também é comumente usada. Um composto formado pela ligação de um grupo fosforila ao C-5′ de uma ose de nucleosídio (o local mais comum para a esterificação do fosfato) é chamado de *nucleosídio 5′-fosfato* ou um *nucleotídio 5′*. Neste sistema de nomenclatura para os nucleotídios, o número dos grupos fosfato e o local de ligação são definidos. Veja, por exemplo, na *adenosina 5′ trifosfato* (ATP, Figura 4.6). Este nucleotídio é extremamente importante porque, além de ser um dos

blocos de construção do RNA, é o mais comumente usado como moeda energética. A energia liberada pela clivagem do grupo trifosfato é usada para energizar muitos processos celulares (Capítulo 15). Outro nucleotídio é o desoxiguanosina 3′monofosfato (3′-dGMP; Figura 4.6). Este nucleotídio é diferente do ATP porque tem guanina em vez de adenina, contém desoxirribose, e não ribose (indicada pelo prefixo “d”), contém um grupo fosforila, em vez de três, e tem o grupo fosforila esterificado ao grupo hidroxila na posição 3′, em vez da 5′.

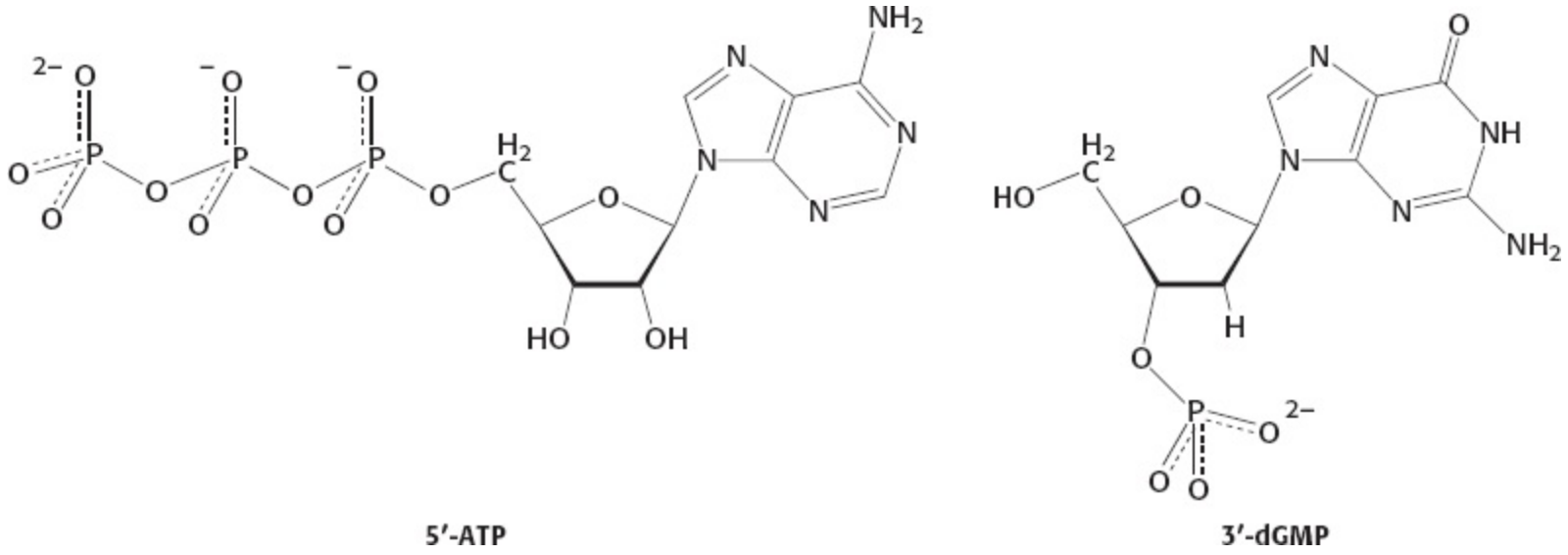


Figura 4.6 Nucleotídios adenosina 5′-trifosfato (5-ATP) e desoxiguanosina 3′-monofosfato (3′-dGMP).

Comunicações científicas frequentemente necessitam da sequência de um ácido nucleico – em alguns casos, uma sequência de milhares de nucleotídios de comprimento – a ser escrita como aquela na página 19. Em vez de escrever as enormes estruturas químicas, os pesquisadores adotaram o uso de abreviações. As notações abreviadas pApCpG e ACG denotam um trinucleotídio de DNA constituído por blocos de construção de desoxiadenilato monofosfato, desoxicitidilato monofosfato e desoxiguanilato monofosfato ligados por pontes fosfodiéster, em que o “p” indica um grupo fosforlia (Figura 4.7). A extremidade 5′ sempre terá um grupo fosforila ligado ao grupo hidroxila 5′. Observe que, como em um polipeptídio (Seção 2.2), *uma cadeia de DNA tem direcionalidade*, em geral chamada de polaridade. Uma extremidade da cadeia tem um grupo hidroxila 5′ (ou um grupo 5′-OH ligado a um grupo fosforila) e a outra extremidade tem um grupo 3′-OH livre, e nenhum dos dois ligados a outro nucleotídio. Por convenção, *a sequência da base é escrita na direção de 5′ para 3′*. Assim, o ACG indica que o grupo 5′-OH está no desoxiadenilato, enquanto o grupo 3′-OH não ligado está no desoxiguanilato. Por conta desta polaridade, ACG e GCA correspondem a compostos diferentes.

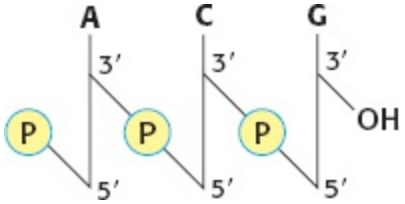


Figura 4.7 Estrutura de uma cadeia de DNA. A cadeia tem uma extremidade 5′, que é normalmente ligada a um grupo fosforila, e uma extremidade 3′, que normalmente tem um grupo hidroxila livre.

As moléculas de DNA são muito extensas

Uma característica marcante das moléculas de DNA na natureza é seu comprimento. Uma molécula de DNA tem de conter muitos nucleotídios para carrear a informação genética necessária mesmo dos organismos mais simples. Por exemplo, o DNA de um vírus como o polioma, que causa câncer em certos organismos, consiste em duas fitas entrelaçadas de DNA, cada uma com 5.100 nucleotídios de comprimento. O genoma da *E. coli* é uma única molécula de DNA constituída de duas cadeias de 4,6 milhões de nucleotídios em cada (Figura 4.8).

Figura 4.8 Micrografia eletrônica de parte do genoma da *E. coli*. [Dr. Gopal Murti/Science Photo Library/Photo Researchers.]

As moléculas de DNA de organismos superiores podem ser muito maiores. O genoma humano contém aproximadamente 3 bilhões de nucleotídios em cada cadeia de DNA, dividida em aproximadamente 24 moléculas de DNA distintas chamadas de cromossomos (22 cromossomos autossômicos, mais os cromossomos sexuais X e Y), com diferentes tamanhos. Uma das maiores moléculas de DNA conhecida é encontrada no "muntjac" ("muntiacus") da Índia, um cervo asiático; seu genoma é aproximadamente do mesmo tamanho que o humano, mas é distribuído em apenas 3 cromossomos (Figura 4.9). O maior destes cromossomos tem duas cadeias de mais de 1 bilhão de nucleotídios cada. Se tal molécula de DNA pudesse ser completamente estendida, ela teria mais de 30 cm de comprimento. Algumas plantas contêm moléculas de DNA ainda maiores.

Figura 4.9 O cervo muntjac da Índia e seus cromossomos. As células de uma fêmea do cervo muntjac da Índia (direita) contêm três pares de cromossomos bem grandes (corados em laranja). A célula mostrada é uma híbrida, contendo um par de cromossomos humanos (corados em verde) para comparação. [(Esquerda) M. Birkhead, OSF/Animals Animals. (Direita) J.-Y. Lee, M. Koi, E. J. Stanbridge, M. Oshimura, A. T. Kumamoto, e A. P. Feinberg. *Nat. Genet.* 7:30, 1994.]

4.2 Um par de cadeias de ácidos nucleicos com sequências complementares pode formar uma estrutura em dupla hélice

Como discutido no Capítulo 1, a estrutura covalente dos ácidos nucleicos é responsável por sua capacidade de carrear a informação na forma de uma sequência de bases ao longo da cadeia de ácidos nucleicos. As bases nas duas fitas separadas de ácidos nucleicos formam *pares de bases específicos* de tal modo que uma estrutura helicoidal é formada. A estrutura em dupla hélice do DNA facilita a *replicação* do material genético – isto é, a geração de duas cópias de um ácido nucleico a partir de uma.

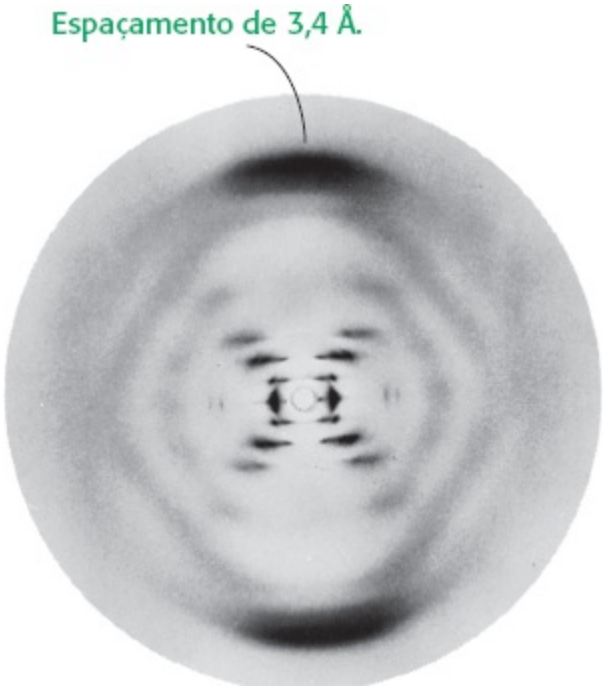


Figura 4.10 Fotografia de difração de raios X de uma fibra de DNA hidratada. Quando cristais de uma biomolécula são irradiados com raios X, estes raios são difratados e vistos como uma série de pontos, chamadas de reflexos, na tela por trás do cristal. A estrutura da molécula pode ser determinada por meio do padrão das reflexões (Seção 3.6). Em relação aos cristais de DNA, a cruz central é um diagnóstico de uma estrutura helicoidal. Os arcos bem marcados no meridiano se originam do empilhamento das bases de nucleotídios, que estão a 3,4 Å de distância. [Cortesia do Dr. Maurice Wilkins.]

A dupla hélice é estabilizada por pontes de hidrogênio e interações van der Waals

A capacidade dos ácidos nucleicos de formar pares de bases específicos foi descoberta em meio a pesquisas cujo objetivo era o de determinar a estrutura tridimensional do DNA. Maurice Wilkins e Rosalind Franklin obtiveram fotografias de difração de raios X de fibras de DNA (Figura 4.10). As características destes padrões de difração indicaram que o DNA é formado por duas cadeias que se dispõem em uma estrutura helicoidal regular. A partir destes dados e de outros, James Watson e Francis Crick deduziram um modelo estrutural para o DNA que explicava o padrão de difração e foi a fonte de algumas notáveis ideias sobre as propriedades funcionais dos ácidos nucleicos (Figura 4.11).

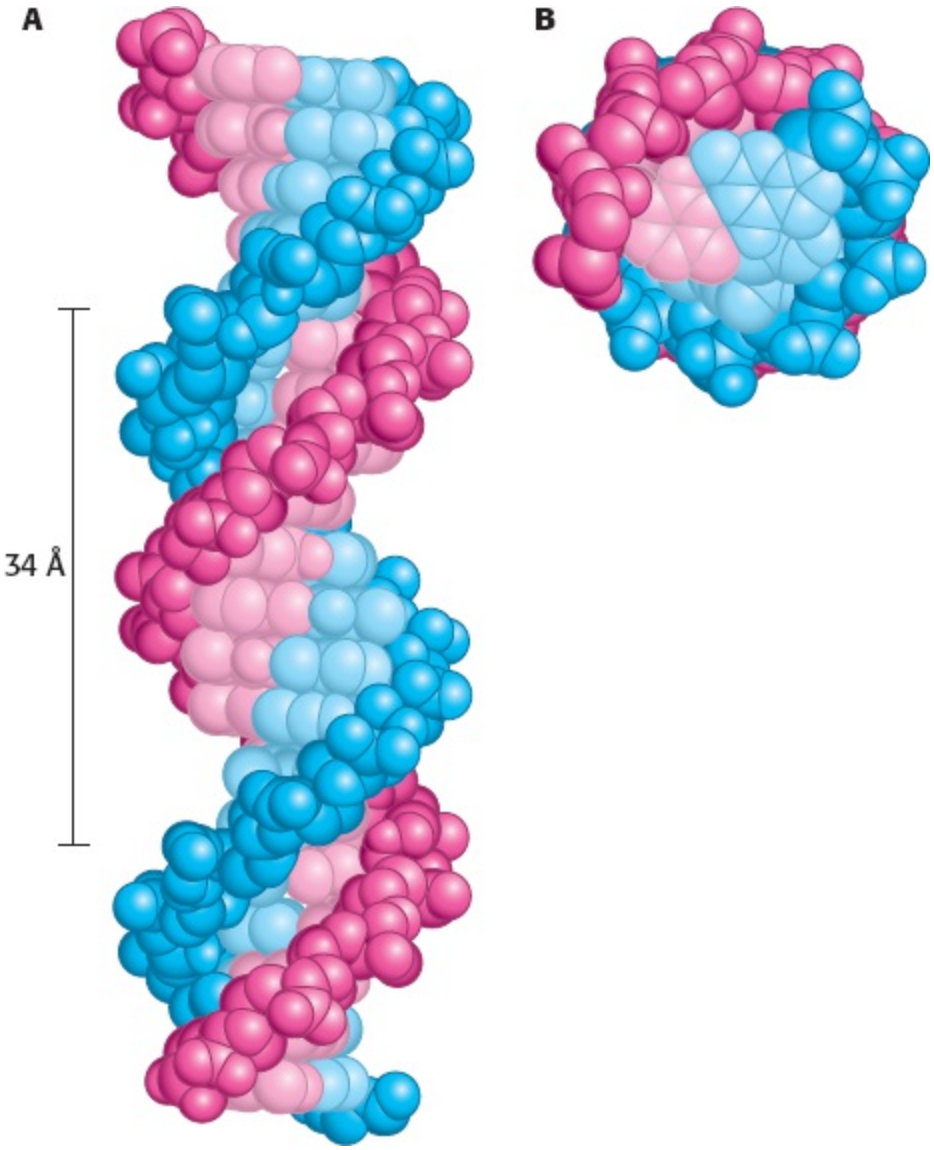


Figura 4.11 Modelo Watson-Crick do DNA em dupla hélice. Uma cadeia de polinucleotídios é mostrada em azul e a outra, em vermelho. As bases purínicas e pirimidínicas são mostradas em tons mais claros que aqueles do arcabouço de ose-fosfato. **A.** Vista lateral. A estrutura se repente ao longo do eixo helicoidal (vertical) em intervalos de 34 Å, que corresponde a 10 nucleotídios em cada cadeia. **B.** Vista axial, olhando pelo eixo da hélice.

As características do modelo de Watson-Crick do DNA, deduzidas a partir dos padrões de difração, são:

1. Duas cadeias helicoidais polinucleotídicas são enroladas em torno de um eixo comum, com

rotação no sentido horário (p. 41). As cadeias são antiparalelas, o que significa que têm polaridade oposta.

2. O arcabouço de ose-fosfato está no exterior, e as bases purínicas e pirimidínicas se dispõem no interior da hélice.

3. As bases são aproximadamente perpendiculares ao eixo da hélice, e as bases adjacentes são separadas por 3,4 Å. Este espaçamento é bem aparente no padrão de difração do DNA (Figura 4.10). A estrutura helicoidal se repete a cada 34 Å e, portanto, há 10 bases (= 34 Å por repetição/3,4 Å por base) a cada volta da hélice. Cada base é rotada em 36° em relação à base abaixo (360° a cada volta completa/10 bases por volta).

4. O diâmetro da hélice é de 20 Å.

Como uma estrutura regular como esta pode acomodar uma sequência arbitrária de bases, considerando os diferentes tamanhos e formas das purinas e pirimidinas? Ao tentar responder estas questões, Watson e Crick descobriram que a guanina pode ser pareada com a citosina e a adenina com a timina, para formar pares de bases que têm essencialmente a mesma forma (Figura 4.12). Estes pares de bases são mantidos unidos por pontes de hidrogênio específicas, as quais, embora fracas (4 a 21 kJ mol^{-1}, ou 1 a 5 kcal mol^{-1}), estabilizam a hélice em função de sua grande quantidade na molécula de DNA. Estas *regras de pareamento de bases* explicam a observação, originalmente feita por Erwin Chargaff em 1950, que as razões de adenina para timina e de guanina para citosina são aproximadamente as mesmas em todas as espécies estudadas, enquanto a razão de adenina para guanina varia consideravelmente (Tabela 4.1).

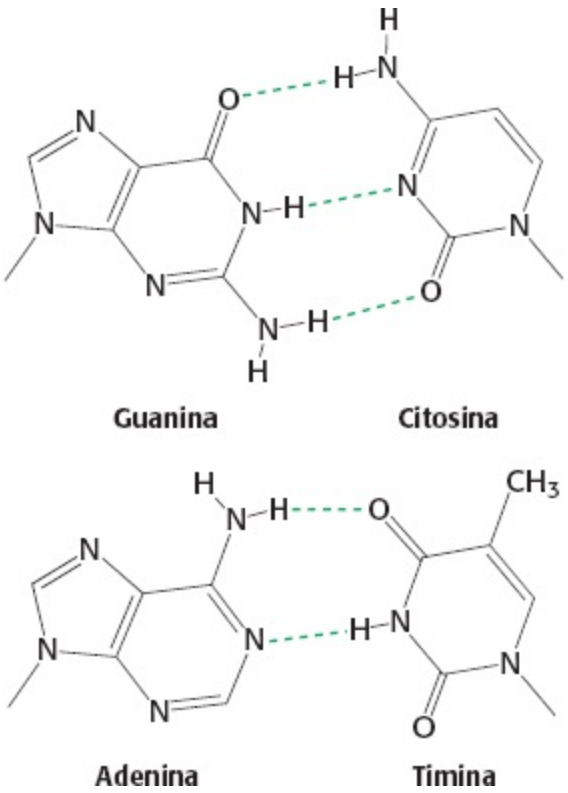


Figura 4.12 Estruturas dos pares de base propostas por Watson e Crick.

Dentro da hélice as bases são essencialmente empilhadas umas sobre as outras (Figura 4.13). O empilhamento de bases contribui para a estabilidade da dupla hélice de duas maneiras.

Primeiramente, a dupla hélice é estabilizada pelo efeito hidrofóbico (p. 11). As bases hidrofóbicas agrupam-se no interior da hélice, longe da água circundante, enquanto as superfícies mais polares são expostas à água. Esta organização é reminiscente do enovelamento de proteínas, onde os aminoácidos hidrofóbicos estão no interior da proteína e os aminoácidos hidrofílicos, no exterior (Seção 2.4). O efeito hidrofóbico empilha as bases umas sobre as outras. Os pares de bases empilhados se atraem mutuamente por meio de forças de van der Waals (p. 10), apropriadamente denominadas *forças de empilhamento*, contribuindo ainda mais para a estabilização da hélice. A energia associada a uma única interação van der Waals é bem pequena, tipicamente de 2 a 4 kJ mol^{-1} (0,5 a 1 kcal mol^{-1}). Na dupla hélice, no entanto, um grande número de átomos está em contato van der Waals e o efeito total, somado destes pares de átomos, é substancial. Adicionalmente, o empilhamento de bases no DNA é favorecido pelas conformações relativamente rígidas dos anéis pentaméricos das oses do arcabouço.

Tabela 4.1 Composições de bases determinadas experimentalmente para uma variedade de organismos.

Organismo	A:T	G:C	A:G
Seres humanos	1,00	1,00	1,56
Salmão	1,02	1,02	1,43
Trigo	1,00	0,97	1,22
Levedura	1,03	1,02	1,67
Escherichia coli	1,09	0,99	1,05
Serratia marcescens	0,95	0,86	0,70

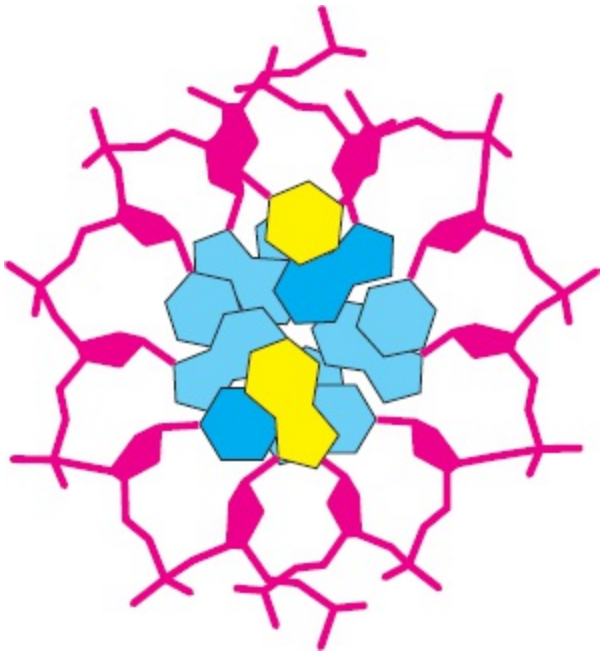


Figura 4.13 Vista axial do DNA. Os pares de base estão empilhados aproximadamente um sobre o outro na dupla hélice.

O DNA pode assumir uma variedade de formas estruturais

Watson e Crick basearam seu molde (conhecido como a *hélice de B-DNA*) nos padrões de difração de raios X de fibras altamente hidratadas de DNA, que forneceram informações sobre as propriedades da dupla hélice que são "médias", a partir de seus resíduos constituintes Sob condições fisiológicas, a maior parte do DNA está em sua forma B. Estudos de difração de raios X de fibras de DNA menos hidratadas revelaram uma forma diferente chamada de *A-DNA*. Como o B-DNA, o A-DNA é uma dupla hélice com rotação em sentido horário, constituída por fitas antiparalelas mantidas unidas pelo pareamento de bases de Watson-Crick. A forma A é mais larga e curta que a forma B da hélice, e seus pares de bases são inclinados, ao em vez de perpendiculares, ao eixo da hélice (Figura 4.14).

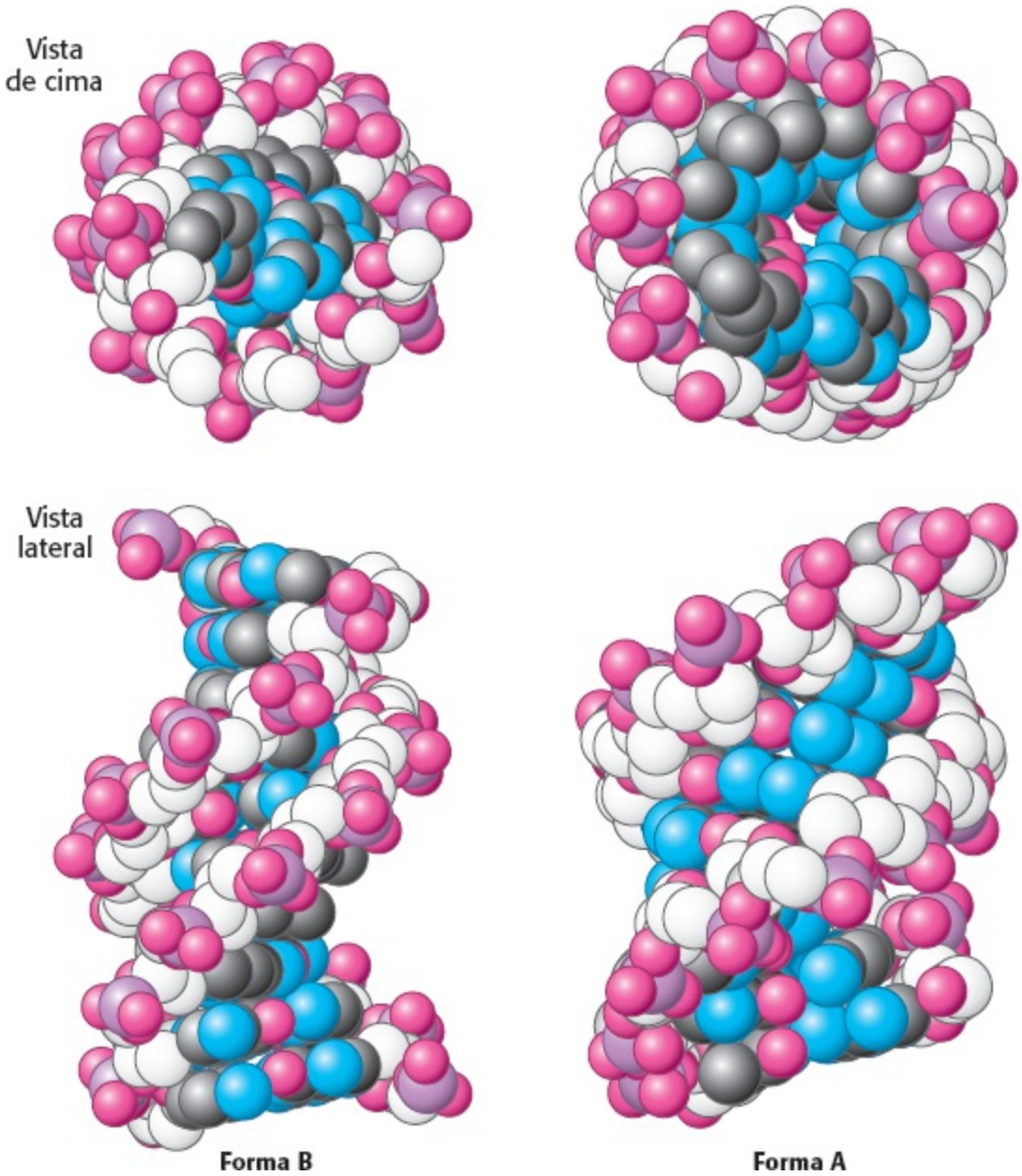
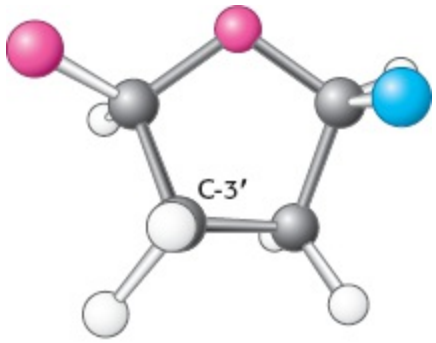


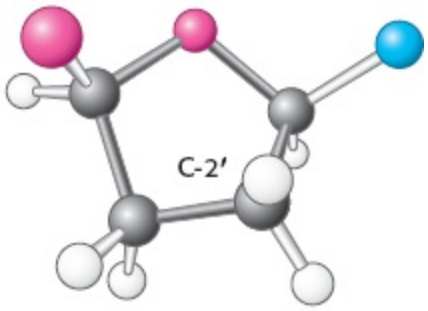
Figura 4.14 Formas B e A do DNA. Modelo de preenchimento espacial de 10 pares de bases da forma B e da forma A do DNA demonstram suas estruturas em sentido horário. *Observe* que a hélice da forma B é mais longa e estreita do que a hélice da forma A. Os átomos de carbono do arcabouço são mostrados em branco. [Desenhada a partir de 1BNA.pdb e 1DNZ.pdb.]

Se a forma A da hélice fosse simplesmente uma propriedade do DNA desidratado, seria de pouca significância. No entanto, regiões de dupla fita do RNA e pelo menos alguns híbridos de RNA-DNA adotam uma forma em dupla hélice muito similar àquela do A-DNA. Qual é a base bioquímica das

diferenças entre as duas formas de DNA? Muitas das diferenças estruturais entre o B-DNA e o A-DNA se originam pela conformação das unidades de ose (Figura 4.15). No A-DNA, C-3′ encontra-se fora do plano (uma conformação conhecida como C-3′ endo) formado pelos outros quatro átomos do anel; no B-DNA, C-2′ encontra-se fora do plano (uma conformação conhecida como C-2′ endo). A disposição C-3′ no A-DNA leva a uma inclinação de 11° dos pares de bases em relação ao eixo perpendicular da hélice. As hélices de RNA são adicionalmente induzidas a assumir a forma de A-DNA por conta de impedimentos estéricos do grupo hidroxila 2′: o átomo de oxigênio 2′ estaria excessivamente próximo aos três átomos do grupo fosforila adjacente e a um átomo da próxima base. Em uma hélice A, ao contrário, o átomo de oxigênio 2′ se projeta externamente, afastando-se dos outros átomos. Na hélice em sua forma A, o grupo fosforila – e demais – se ligam a um número menor de moléculas de H_2O do que aqueles no B-DNA. Deste modo, a desidratação favorece a forma A.



C-3′ endo (forma A)



C-2′ endo (forma B)

Figura 4.15 Conformação da ose. Na forma A do DNA, o carbono C-3′ se localiza aproximadamente acima do plano definido pelos quatro outros átomos da ose (chamado de C-3′ endo). Na forma B do DNA, cada desoxirribose está em uma conformação C-2′ endo, na qual o C-2′ se localiza fora do plano.

O Z-DNA é uma dupla hélice com sentido anti-horário na qual os fosfatos do arcabouço estão em zigue-zague

Alexander Rich e seus colaboradores descobriram um terceiro tipo de hélice de DNA quando resolveram a estrutura de CGCGCG. Eles descobriram que este hexanucleotídio forma uma dupla de fitas antiparalelas unidas pelo pareamento de bases de Watson-Crick, como esperado. Surpreendente, no entanto, foi que esta hélice era *anti-horária*, ao contrário do sentido *horário* das hélices de A-DNA e B-DNA. Além disso, os fosfatos no arcabouço estão em zigue-zague; assim, eles chamaram esta forma de *Z-DNA* (Figura 4.16).

A existência de Z-DNA mostra que o DNA é uma molécula flexível e dinâmica. Embora o papel biológico do Z-DNA ainda esteja sob investigação, proteínas ligantes de Z-DNA necessárias para patogênese viral foram isoladas do poxvírus, incluindo o vírus da varíola. As propriedades das formas A, B e Z do DNA são comparadas na Tabela 4.2.

Algumas moléculas de DNA são circulares e em super-hélice

As moléculas de DNA no cromossomo humano são lineares. No entanto, a microscopia eletrônica e outros estudos mostraram que moléculas intactas de DNA de bactérias e *archea* são circulares (Figura 4.17A). O termo circular se refere à continuidade das cadeias de DNA, não à sua forma geométrica. As moléculas de DNA dentro das células têm de ter uma forma muito compacta. Observe que o cromossomo da *E. coli*, estendido, teria aproximadamente 1.000 vezes o tamanho do maior diâmetro da bactéria.

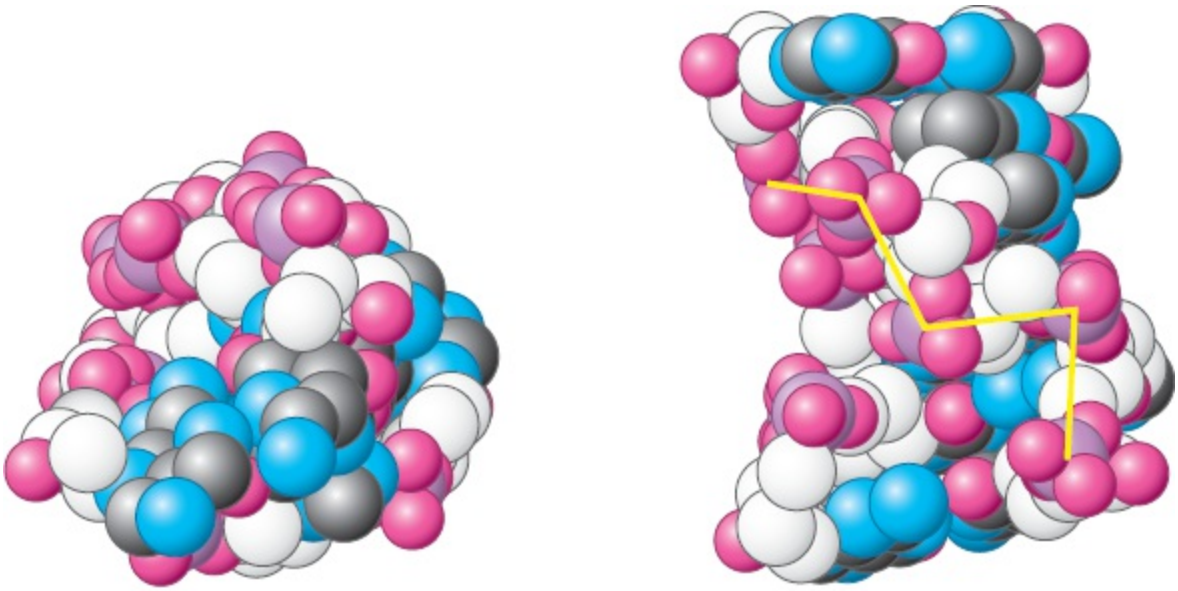


Figura 4.16 Z-DNA. Oligômeros de DNA como CGCGCG adotam uma conformação alternativa sob algumas circunstâncias. Esta conformação é chamada de Z-DNA porque os grupos fosforila ziguezagueiam ao longo do arcabouço. [Desenhada a partir de 131D.pdb.]

Tabela 4.2 Comparação entre as formas A, B e Z do DNA

	Tipo de hélice		
	A	B	Z
Forma	Mais larga	Intermediária	Mais estreita
Elevação por par de base	2,3 Å	3,4 Å	3,8 Å
Diâmetro da hélice	25,5 Å	23,7 Å	18,4 Å
Direcionalidade	Sentido horário	Sentido horário	Sentido anti-horário
Ligação glicosídica*	*anti*	*anti*	Alternando entre *anti* e *sin*

Pares de base por volta da hélice	11	10,4	12
Passo por volta da hélice	25,3 Å	35,4 Å	45,6 Å
Inclinação dos pares de base em relação ao eixo da hélice	19°	1°	9°

**Sin* e *anti* se referem à orientação da ligação *N*-glicosídica entre a base e a desoxirribose. Na orientação *anti*, a base se afasta da desoxirribose. Na orientação *sin,* a base está acima da desoxirribose. A pirimidina pode assumir apenas orientações *anti*, enquanto as purinas podem assumir *anti* e *sin*.

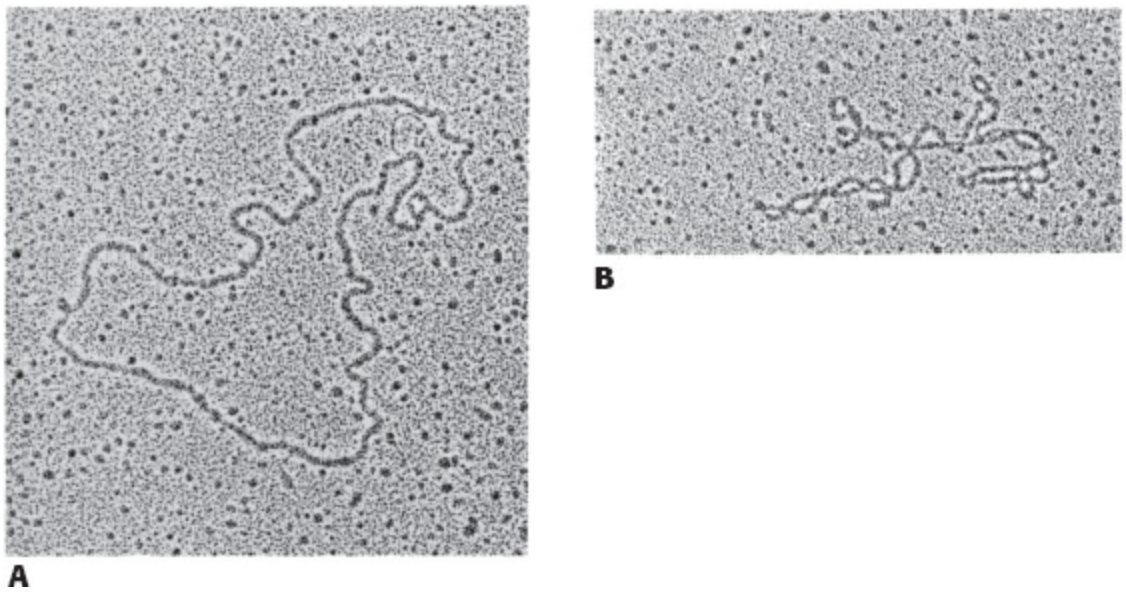


Figura 4.17 Micrografia eletrônica de um DNA circular de mitocôndria. A. Forma relaxada. **B.** Forma em super-hélice. [Cortesia do Dr. David Clayton.]

Uma molécula de DNA fechada tem uma propriedade exclusiva de um DNA circular. O eixo da dupla hélice pode ser torcido ou espiralizado em uma *super-hélice* (Figura 4.17B). Uma molécula circular de DNA sem nenhuma volta em super-hélice é conhecida como uma *molécula relaxada.* A superespiralização é biologicamente importante por duas razões: Primeiramente, *uma molécula de DNA em super-hélice é mais compacta que sua forma relaxada.* Em segundo lugar, *uma super-hélice pode favorecer ou prejudicar a capacidade da dupla hélice em separar-se e, desta maneira, afetar a interação entre o DNA e outras moléculas.* Estas características topológicas do DNA serão consideradas adiante, no Capítulo 28.

Ácidos nucleicos de fita única podem assumir estruturas complexas

Ácidos nucleicos de fita única em geral se dobram sobre si para formarem estruturas bem definidas. Tais estruturas são especialmente proeminentes no RNA e nos complexos que contêm RNA, como os ribossomos – um grande complexo de RNA e proteínas nos quais proteínas são sintetizadas.

O tipo mais simples e mais comum de estrutura é um *grampo*, criado quando duas sequências complementares em uma fita única se unem para formar estruturas em dupla hélice (Figura 4.18). Em muitos casos, estas duplas hélices são completamente feitas com pares de bases de Watson-Crick. Em outros casos, no entanto, as estruturas incluem pares de base trocadas ou bases solitárias que saem da hélice. Tais pares de bases trocadas desestabilizam a estrutura local, mas introduzem variações à estrutura em dupla hélice padrão que podem ser importantes para o enovelamento posterior e sua

função (Figura 4.19).

Figura 4.18 Estrutura em grampo. As estruturas em haste-alça podem ser formadas a partir de moléculas de DNA e RNA de fita única.

Os ácidos nucleicos de fita única podem adotar estruturas que são mais complexas que a de um simples grampo, por meio de interações entre bases mais afastadas. Em geral, três ou mais bases interagem para estabilizar estas estruturas. Nestes casos, doadores e receptores de pontes de hidrogênio que não participam no pareamento de bases de Watson-Crick, participam das pontes de hidrogênio para formar pareamentos não tradicionais. Íons metálicos como o íon de magnésio (Mg^{2+}) geralmente auxiliam na estabilização destas estruturas mais elaboradas. Estas estruturas complexas permitem que o RNA exerça um conjunto de funções que o DNA em fita dupla não pode executar. De fato, a complexidade de algumas moléculas de RNA rivaliza a das proteínas, e estas moléculas de RNA exercem um grande número de funções que antes eram consideradas exclusivas das proteínas.

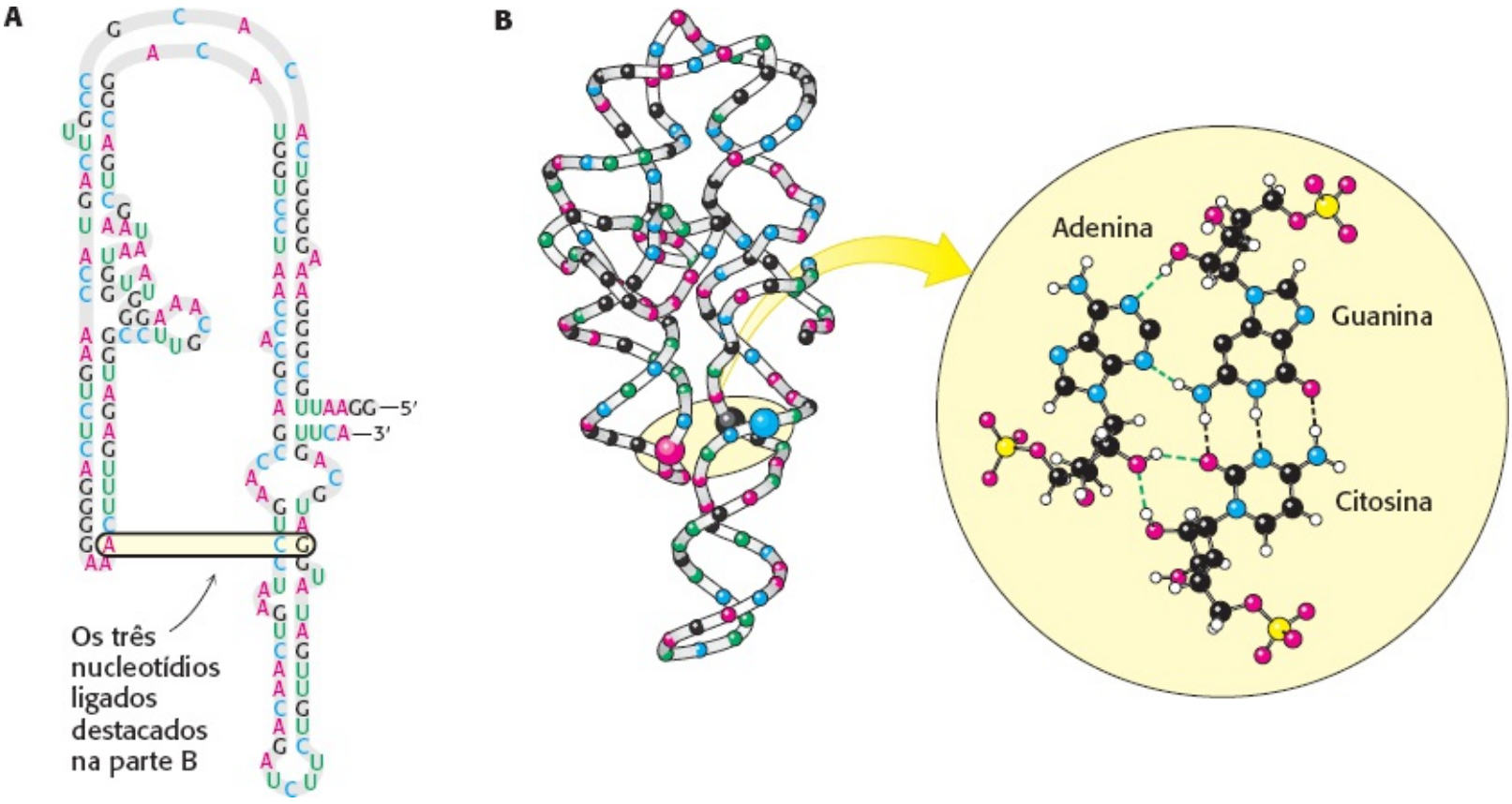


Figura 4.19 Estrutura complexa de uma molécula de RNA. Uma molécula de fita simples de RNA pode se dobrar sobre si mesma para formar uma estrutura complexa. **A.** A sequência de nucleotídios exibindo os pares de base Watson-Crick e outros pareamentos não usuais das bases em estruturas em grampo. **B.** A estrutura tridimensional e uma importante interação de longa distância entre três bases. Na estrutura tridimensional à esquerda, os nucleotídios de citidina são mostrados em azul, adenosina em vermelho, guanosina em preto e uridina em verde. Na projeção detalhada, as pontes de hidrogênio nos pares de base Watson-Crick são mostradas como linhas pretas tracejadas; pontes de hidrogênio adicionais são mostradas como linhas verdes tracejadas.

4.3 A dupla hélice facilita a transmissão precisa da informação hereditária

O modelo de dupla hélice do DNA e a presença de pares de bases específicos sugeriram imediatamente como o material genético poderia se replicar. *A sequência de bases de uma fita da dupla hélice determina precisamente a sequência da outra fita:* uma base guanina em uma fita é sempre pareada com uma base citosina na outra fita, e assim sucessivamente. Desta maneira, a separação da dupla hélice em suas duas cadeias constituintes forneceria dois moldes de fita única nos quais novas duplas hélices poderiam ser feitas, cada uma com a mesma sequência de bases que a dupla hélice original. Consequentemente, à medida que o DNA é replicado, uma das cadeias de cada molécula de DNA filha é sintetizada, enquanto a outra é passada sem modificações a partir da molécula de DNA original. Esta distribuição de átomos parentais é obtida por meio da *replicação semiconservativa.*

As diferenças da densidade do DNA estabeleceram a validade da hipótese da replicação semiconservativa

Matthew Meselson e Franklin Stahl realizaram um experimento crítico para testar esta hipótese em 1958. Eles marcaram o DNA parental com o ^{15}N, um isótopo pesado do nitrogênio, para fazê-lo mais denso que o DNA comum. O DNA marcado foi gerado por meio de uma cultura de *E. coli* por várias gerações em um meio que continha $^{15}NH_4Cl$ como a única fonte de nitrogênio. Após a incorporação completa do nitrogênio pesado, a bactéria foi abruptamente transferida para um meio que continha ^{14}N, o isótopo usual do nitrogênio. A pergunta subjacente era: Qual a distribuição de ^{14}N e ^{15}N nas moléculas de DNA após sucessivas etapas de replicação?

A distribuição de ^{14}N e ^{15}N foi revelada pela técnica de *equilíbrio de sedimentação por gradiente de densidade.* Uma pequena quantidade de DNA era dissolvida em uma solução concentrada de cloreto de césio, cuja densidade era próxima ao do DNA (1,7 g cm^{-3}). Esta solução foi centrifugada até que estivesse próxima ao equilíbrio. Neste ponto, os processos opostos de sedimentação e difusão criavam um gradiente de concentração de cloreto de césio ao longo do tubo de centrifugação. O resultado era um gradiente de densidade estável, variando de 1,66 a 1,76 g cm^{-3}. As moléculas de DNA neste gradiente de densidade eram dirigidas pela força centrífuga para a região onde a densidade da solução fosse igual à sua própria. O DNA gerou uma banda estreita que foi detectada por sua absorção da luz ultravioleta. Uma mistura de DNA ^{14}N e ^{15}N gerou bandas nitidamente separadas, porque elas diferem em sua densidade em aproximadamente 1% (Figura 4.20).

O DNA era extraído das bactérias em vários momentos após ser transportado do meio com ^{15}N para o meio com ^{14}N. A análise destas amostras pela técnica de gradiente de densidade mostrou que havia uma única banda de DNA após uma geração. A densidade desta banda localizava-se

precisamente na metade do caminho entre as densidades das bandas do DNA ^{14}N e do DNA ^{15}N (Figura 4.21). *A ausência de DNA ^{15}N indicava que o DNA parental não era completamente preservado como uma unidade intacta após a replicação.* A ausência de ^{14}N indicava que todo o DNA filho derivava parte de seus átomos do DNA parental. Esta proporção tinha de ser a metade porque a densidade da banda do DNA híbrido estava no meio caminho entre as densidades das bandas de DNA ^{14}N e ^{15}N.

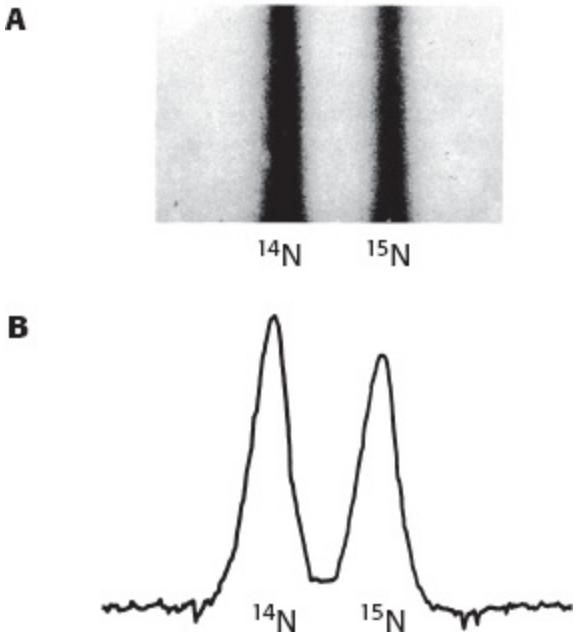


Figura 4.20 Resolução do DNA ^{14}N e ^{15}N por centrifugação em gradiente de densidade. A. A fotografia da absorção do ultravioleta obtida de um tubo centrifugado mostrando duas bandas distintas de DNA. **B.** O traço densitométrico da fotografia da absorção. [De M. Meselson e F. W. Stahl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 44:671-682, 1958.]

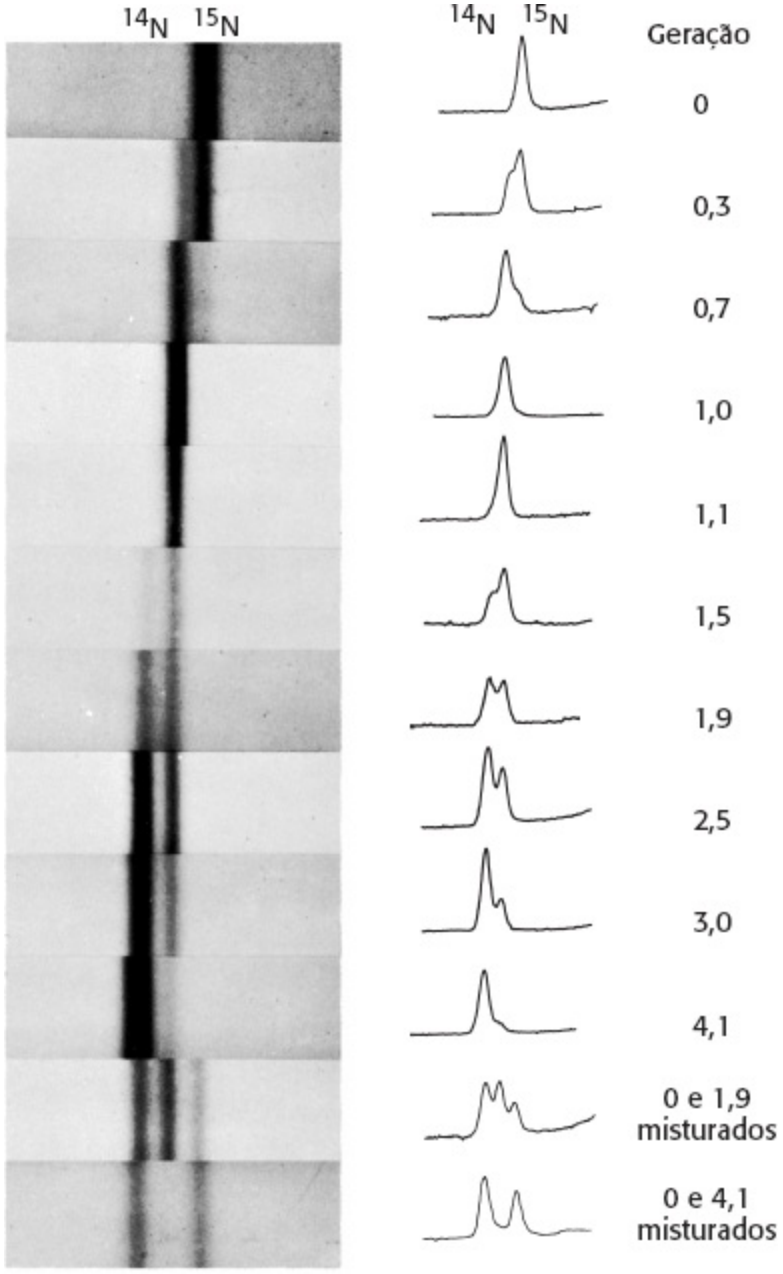


Figura 4.21 Detecção da replicação semiconservativa do DNA de E. *Coli* por centrifugação em gradiente. A posição de uma banda de DNA depende do seu conteúdo de ^{14}N e ^{15}N. Depois de 1,0 geração, todas as moléculas de DNA eram hibridas, contendo quantidades iguais de ^{14}N e ^{15}N [De M. Meselson e F. W. Stahl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 44:671-682, 1958.]

Após duas gerações, havia quantidades iguais das duas bandas de DNA. Uma era de DNA híbrido e a outra, de DNA ^{14}N. Meselson e Stahl concluíram, a partir destes experimentos, que a replicação era semiconservativa e que cada nova dupla hélice continha uma fita parental e uma fita recémsintetizada. Estes resultados concordavam perfeitamente com o modelo de Watson-Crick da replicação do DNA (Figura 4.22).

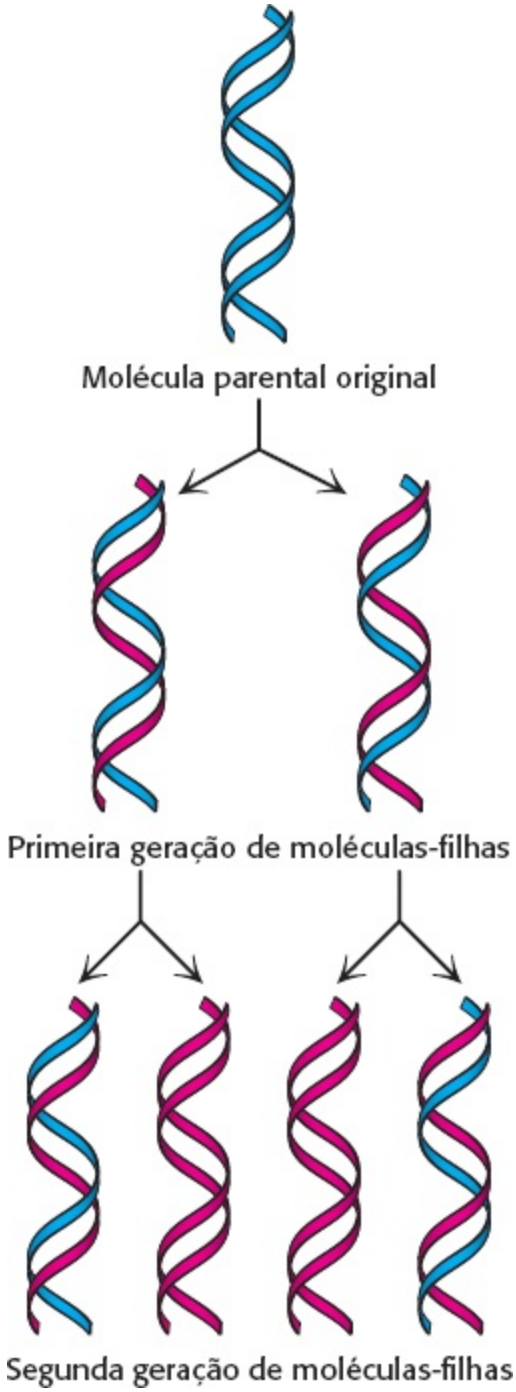


Figura 4.22 Diagrama de uma replicação semiconservativa. O DNA parental é mostrado em azul e o DNA recém-sintetizado, em vermelho. [De M. Meselson e F. W. Stahl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 44:671-682, 1958.]

A dupla hélice pode ser reversivelmente dissociada

Na replicação do DNA e em outros processos, as duas fitas da dupla hélice de DNA devem ser separadas uma da outra, pelo menos em algumas regiões. As duas fitas da hélice de DNA prontamente se separam quando as pontes de hidrogênio entre os pares de base se quebram. No laboratório, a dupla hélice pode ser dissociada por meio do aquecimento de uma solução de DNA ou pela adição de ácido ou álcali para ionizar as bases. A dissociação da dupla hélice é chamada de *"desnaturação"* (*melting*) porque ocorre abruptamente em certa temperatura. A *temperatura de desnaturação* (T_m) do DNA é definida como a temperatura na qual a metade da estrutura helicoidal é perdida. Dentro das células, no entanto, a dupla hélice não é desnaturada por meio da adição de calor. Em vez disso, proteínas chamadas de *helicases* usam energia química (do ATP) para romper a

hélice (Capítulo 28).

As bases ligadas nos ácidos nucleicos absorvem menos luz ultravioleta do que as bases não ligadas, o que é chamado de efeito *hipocrômico*. Assim, a fusão do ácido nucleico é rapidamente monitorada por meio da medida de sua absorção da luz, que é máxima no comprimento de onda de 260 nm (Figura 4.23).

As fitas complementares separadas dos ácidos nucleicos espontaneamente se reassociam para formar a dupla hélice quando a temperatura é mais baixa que a T_m. Este processo de renaturação é chamado, por vezes, de *anelamento*. A facilidade com a qual as duplas hélices podem ser separadas (desnaturadas) e então reassociadas é crucial para as funções biológicas dos ácidos nucleicos.

A habilidade de desnaturar e reanelar reversivelmente o DNA no laboratório fornece uma poderosa ferramenta para investigar similaridades de sequências. Por exemplo, moléculas de DNA de dois organismos diferentes podem ser desnaturadas e aneladas, ou *hibridizadas,* na presença uma da outra. Se as sequências forem similares, híbridos de DNA dupla fita, com o DNA de cada organismo contribuindo com uma fita da dupla hélice, podem se formar. O nível de hibridização é uma indicação do grau de parentesco dos genomas e, assim, dos organismos. Experimentos similares de hibridização de RNA com DNA podem localizar genes no DNA de uma célula que correspondam a um RNA em particular. Retornaremos a esta técnica importante no Capítulo 5.

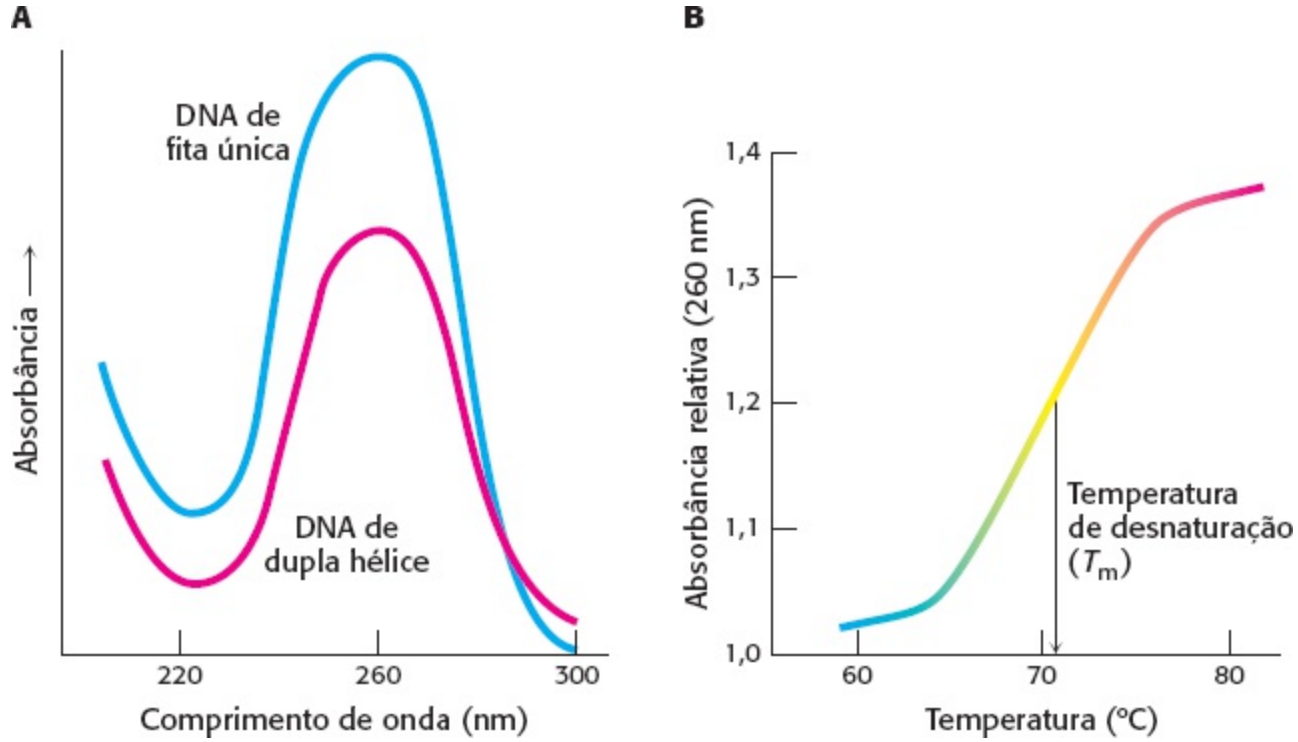


Figura 4.23 Hipocromismo. A. O DNA de fita única absorve a luz mais efetivamente que o DNA de dupla hélice. **B.** A absorbância da solução de DNA no comprimento de onda de 260 nm aumenta quando a dupla hélice é desnaturada em fitas isoladas.

4.4 O DNA é replicado por polimerases que recebem instruções de moldes

Agora nos voltamos ao mecanismo molecular da replicação do DNA. O maquinário completo de replicação em uma célula inclui mais de 20 proteínas relacionadas em uma interação intrincada e coordenada. Em 1958, Arthur Kornberg e seus colegas isolaram de *E. coli* as primeiras enzimas

conhecidas como *DNA polimerases*, que promovem a formação de pontes que unem as unidades do arcabouço de DNA. A *E. coli* tem algumas DNA polimerases, designadas por números romanos, que participam da replicação do DNA e do seu reparo (Capítulo 28).

A DNA polimerase catalisa a formação das pontes fosfodiéster

A DNA polimerase catalisa a adição passo a passo das unidades de desoxirribose à cadeia de DNA (Figura 4.24). A reação catalisada, em sua forma mais simples, é

$$(DNA)_n + dNTP \rightleftharpoons (DNA)_{n+1} + PP_i$$

Em que dNTP representa qualquer desoxirribonucleotídio e PP_i é o íon de pirofosfato.
A síntese de DNA tem as seguintes características:

1. A reação requer todos os quatro precursores ativados – ou seja, *os desoxinucleosídios 5′-trifosfatos dATP, dGTP, dCTP e TTP* – assim como o íon de Mg^{+2}.

2. *A nova cadeia de DNA é montada diretamente sobre o molde de DNA preexistente.* As DNA polimerases catalisarão a formação da ligação fosfodiéster eficientemente apenas se a base do novo nucleosídio trifosfato for complementar à base da fita molde. Assim, a DNA polimerase é uma *enzima direcionada pelo molde* que sintetiza um produto com uma sequência de bases complementar àquela do molde.

3. *As DNA polimerases requerem um iniciador para começar a síntese.* Uma fita *primer* (iniciadora) com um grupo 3′-OH já deve estar ligada à fita molde. A reação de alongamento da cadeia catalisada pela DNA polimerase é um ataque nucleofílico do terminal 3′-OH da cadeia em crescimento ao átomo de fósforo mais interno do trifosfato de desoxinucleosídio (Figura 4.25). Uma ponte fosfodiéster é formada, e o pirofosfato é então liberado. A hidrólise subsequente do pirofosfato para gerar dois íons de ortofosfato (P_i) pela *pirofosfatase* auxilia a polimerização. *O alongamento da cadeia de DNA segue na direção 5′ →3′.*

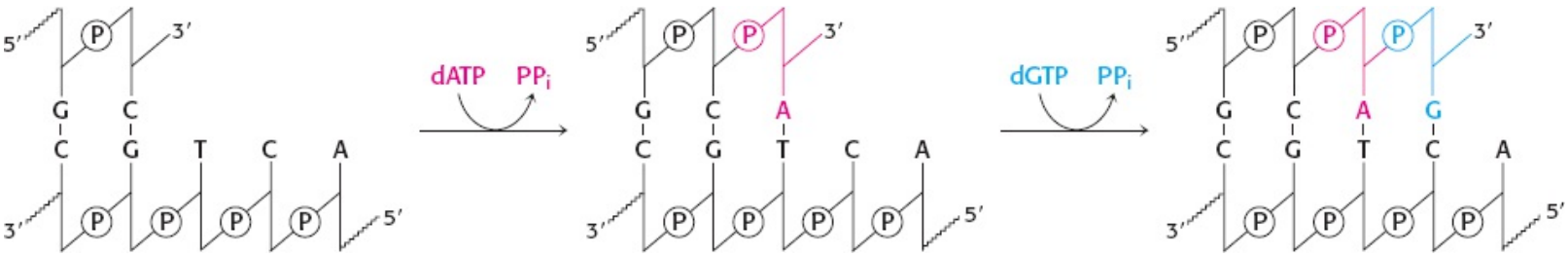


Figura 4.24 Reação de polimerização catalisada pelas DNA polimerases.

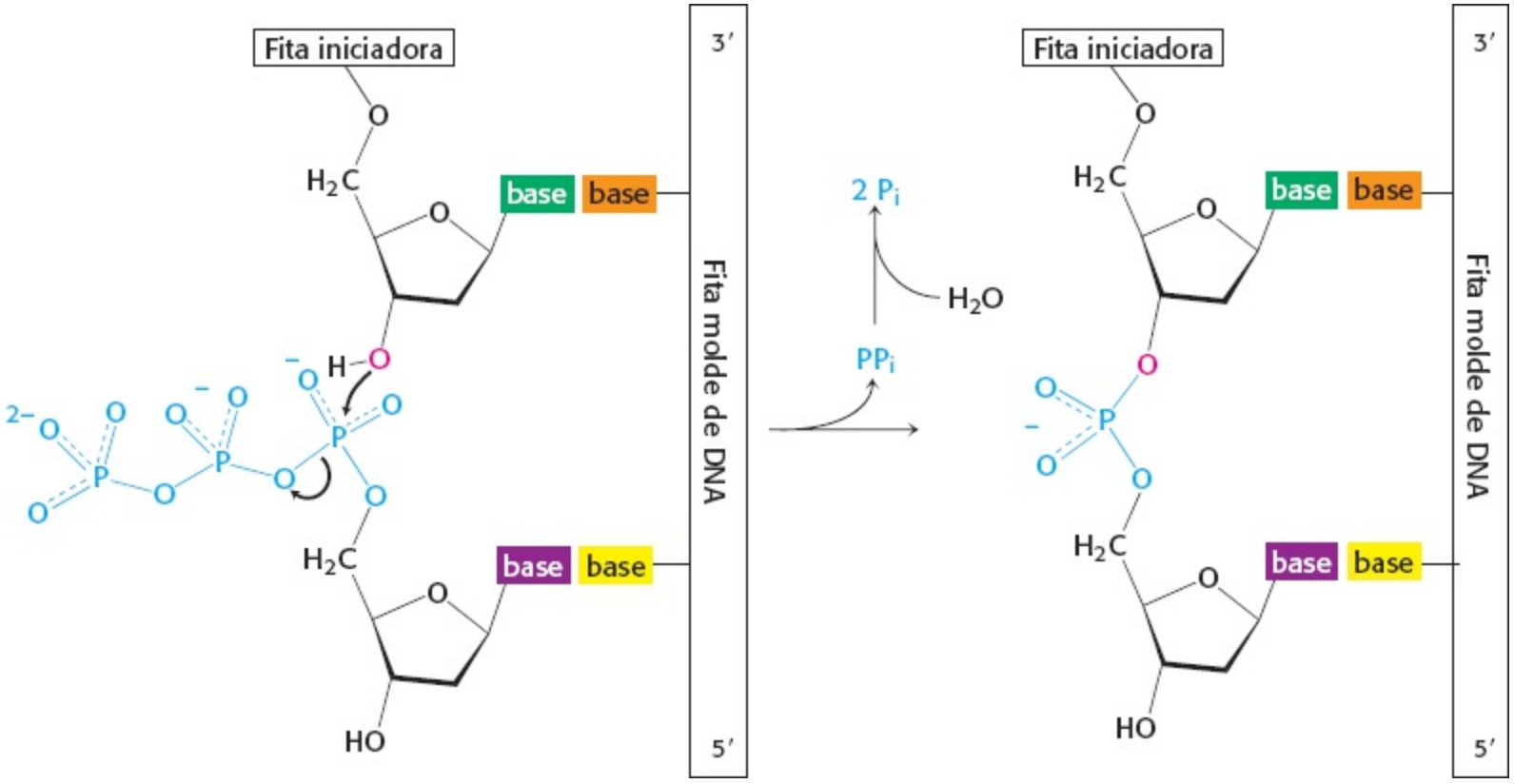


Figura 4.25 Reação de alongamento da cadeia. As DNA polimerases catalisam a formação das pontes fosfodiéster.

4. *Muitas DNA polimerases são capazes de corrigir erros no DNA por meio da remoção de nucleotídios pareados incorretamente.* Estas polimerases têm uma atividade de nuclease diferente, que permite que elas retirem as bases incorretas em uma reação separada. Esta atividade de nuclease contribui para a notável alta fidelidade da replicação do DNA, que tem uma taxa de erro menor que 10^{-8} por par de base.

Os genes de alguns vírus são feitos de RNA

Os genes em todos os organismos celulares são feitos de DNA. O mesmo é verdadeiro para alguns vírus, mas, para outros, o material genético é RNA. Os vírus são elementos genéticos encapsulados em um revestimento proteico que podem se mover de uma célula para outra, mas não são capazes de crescimento independente. Um exemplo bem estudado de um vírus de RNA é o vírus do mosaico do tabaco, que infecta as folhas das plantas de tabaco. O vírus consiste em uma única fita de RNA (6.390 nucleotídios) circundada por um revestimento proteico de 2.130 subunidades idênticas. Uma RNA polimerase que se guia por um molde de RNA, chamada de *RNA polimerase dirigida por RNA*, copia o RNA viral. As células infectadas têm morte celular programada estimulada pelo vírus; em essência, o vírus instrui a célula a cometer suicídio. A morte celular acarreta a descoloração da folha de tabaco em um padrão variado, por isso o nome de vírus mosaico.

Outra importante classe de vírus de RNA inclui os *retrovírus*, assim chamados porque a informação genética segue do RNA para o DNA, em vez do DNA para o RNA. Esta classe inclui o vírus 1 da imunodeficiência humana (HIV-1), a causa da AIDS, assim como uma quantidade de vírus de RNA que produzem tumores em animais suscetíveis. As partículas de retrovírus contêm duas cópias de uma molécula de fita única de RNA. Uma vez que entra na célula, o RNA é copiado a DNA por meio da ação de uma enzima viral chamada *transcriptase reversa* (Figura 4.26). O DNA de

dupla hélice resultante do genoma viral pode ser incorporado ao DNA cromossômico do hospedeiro e é replicado junto com o DNA celular normal. Em um momento posterior, o genoma viral integrado é expresso para formar RNA viral e proteínas virais, que se unem para formar novos vírus.

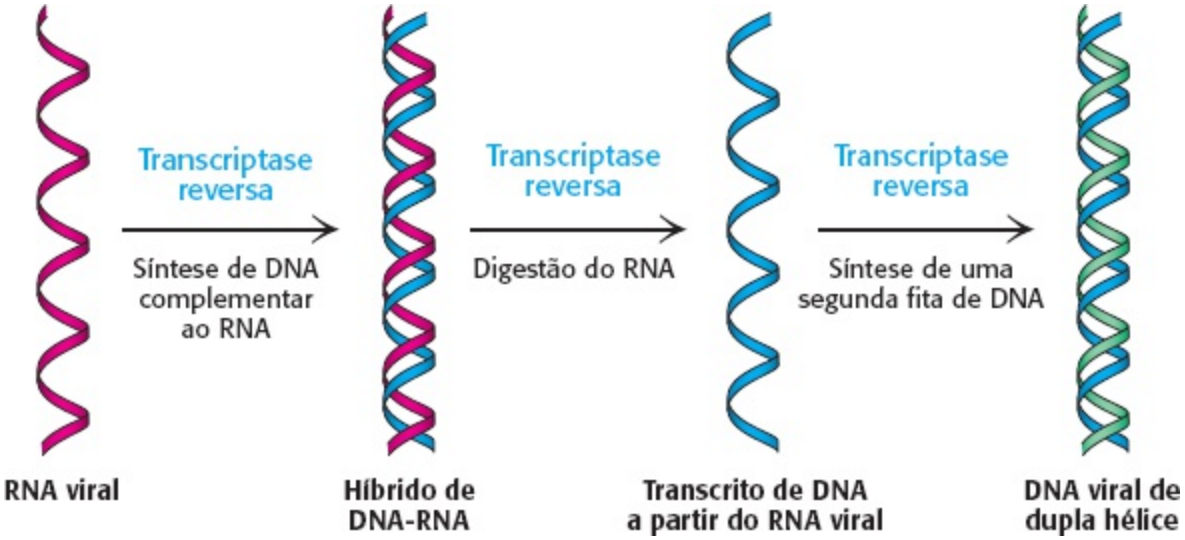


Figura 4.26 Fluxo da informação do RNA para o DNA em retrovírus. O genoma de RNA de um retrovírus é convertido em DNA pela transcriptase reversa, uma enzima que chega à célula pelo vírus infectante. A transcriptase reversa possui diversas atividades e catalisa a síntese de uma fita complementar de DNA, a digestão do RNA e a síntese subsequente de uma segunda fita de DNA.

4.5 A expressão gênica é a transformação da informação do DNA em moléculas funcionais

A informação armazenada como DNA torna-se útil quando é expressa na produção de RNA e proteínas. Este tópico rico e complexo é tema de diversos capítulos ao longo deste livro, mas aqui introduziremos as bases da expressão gênica. O DNA pode ser imaginado como um arquivo de informações, armazenadas e manipuladas parcimoniosamente para minimizar danos (mutações). Ele é expresso em duas etapas. Na primeira, uma cópia de RNA é feita, e esta codifica as instruções para a síntese de proteínas. Este RNA mensageiro pode ser visto como uma fotocópia da informação original: podem ser feitas múltiplas cópias, usadas e depois descartadas. Em segundo lugar, a informação do RNA mensageiro é traduzida para a síntese de proteínas funcionais. Há outros tipos de moléculas de RNA, para facilitar esta tradução.

Diversos tipos de RNA têm papéis-chave na expressão gênica

Os pesquisadores acreditavam que o RNA tinha um papel passivo na expressão gênica, como um mero meio transportador da informação. No entanto, pesquisas recentes têm mostrado que o RNA tem uma variedade de papéis, da catálise à regulação. As células contêm diversos tipos de RNA (Tabela 4.3):

1. *RNA mensageiro* (mRNA) é o molde usado para a síntese de proteínas, ou *tradução*. Uma molécula de mRNA pode ser produzida para cada gene ou grupo de genes a ser expresso na *E. coli*, enquanto um mRNA diferente é produzido para cada gene em eucariotos. Consequentemente, o

mRNA é uma classe de moléculas heterogênea. Em procariotos, o comprimento médio de uma molécula de mRNA é de 1,2 quilobase (kb). Em eucariotos, o mRNA tem características estruturais, tais como as estruturas em grampo, que regulam a eficiência da tradução e a duração (meia-vida) do mRNA.

Tabela 4.3 Moléculas de RNA na *E. coli*.

Tipo	Quantidade relativa (%)	Coeficiente de sedimentação	Massa (kDa)	Número de nucleotídios
RNA ribossômico (rRNA)	80	23	$1,2 \times 10^3$	3.700
		16	$0,55 \times 10^3$	1.700
		5	$3,6 \times 10^1$	120
RNA transportador (tRNA)	15	4	$2,5 \times 10^1$	75
RNA mensageiro (mRNA)	5		Heterogêneo	

2. *RNA transportador* (tRNA) transporta os aminoácidos em forma ativada para o ribossomo, para a formação da ligação peptídica, em uma sequência determinada pelo molde de mRNA. Há pelo menos um tipo de tRNA para cada um dos 20 aminoácidos. O RNA transportador é constituído por aproximadamente 75 nucleotídios (com uma massa de aproximadamente 25 kDa).

3. *RNA ribossômico* (rRNA) é o componente principal dos ribossomos (Capítulo 30). Em procariotos, há três tipos de rRNA, chamados de *RNA 23S, 16S e 5S* em função do seu padrão de sedimentação. Uma molécula de cada espécie de rRNA está presente em um ribossomo. Acreditava-se anteriormente que o RNA ribossômico tinha apenas papel estrutural nos ribossomos. Hoje sabemos que o rRNA é o verdadeiro catalisador para a síntese de proteínas.

Quilobase (kb)
Uma unidade de comprimento igual a 1.000 pares de bases de uma molécula de ácido nucleico bifilamentar (ou 1.000 bases de uma molécula unifilamentar). Uma quilobase de DNA bifilamentar tem o comprimento de 0,34 mm e uma massa de cerca de 660 kDa.

O RNA ribossômico é o mais abundante dos três tipos de RNA. O RNA transportador vem em segundo lugar, seguido pelo RNA mensageiro, que constitui apenas 5% do RNA total. As células eucarióticas contêm adicionalmente pequenas moléculas de RNA.

4. As moléculas de *RNA nuclear pequeno* (snRNA) participam no *splicing* dos éxons de RNA.

5. Uma pequena molécula de RNA é um componente essencial da *partícula de reconhecimento de sinal*, um complexo de RNA e proteínas no citoplasma que auxilia o direcionamento de proteínas recém-sintetizadas aos seus destinos em compartimentos intra e extracelulares.

6. O *micro RNA* (miRNA) é uma classe de RNA pequenos (cerca de 21 nucleotídios) não codificantes que se liga de maneira complementar às moléculas de mRNA e inibem sua tradução.

7. *Pequeno RNA de interferência* (siRNA) é uma classe de pequenas moléculas de RNA que se ligam ao mRNA e facilitam sua degradação. O micro RNA e pequenos RNA de interferência também fornecem aos pesquisadores poderosas ferramentas experimentais para inibir a expressão de genes específicos da célula.

8. O RNA é um componente da *telomerase*, uma enzima que mantém o telômero (extremidades) dos cromossomos durante a replicação do DNA.

Neste capítulo, consideraremos rRNA, mRNA e o tRNA.

Todo o RNA celular é sintetizado por RNA polimerases

A síntese do RNA a partir do molde de DNA é chamada de *transcrição* e é catalisada pela enzima *RNA polimerase* (Figura 4.27). A RNA polimerase catalisa o início e o alongamento das cadeias de RNA. A reação catalisada por esta enzima é

$$(RNA)_n + \text{ribonucleosídio trifosfato} \rightleftharpoons (RNA)_{n+1} + PP_i$$

A RNA polimerase requer os seguintes componentes:

1. *Um molde*. O molde preferido é o *DNA de fita dupla*. O DNA de fita única pode também servir como molde. O RNA, seja de fita única ou dupla, não é um molde efetivo, assim como não o são os híbridos de RNA-DNA.

2. *Precursores ativados*. Todos os quatro ribonucleosídios trifosfatos – ATP, GTP, UTP e CTP – são necessários.

3. *Um íon metálico divalente*. Tanto Mg^{2+} ou Mn^{2+}são efetivos.

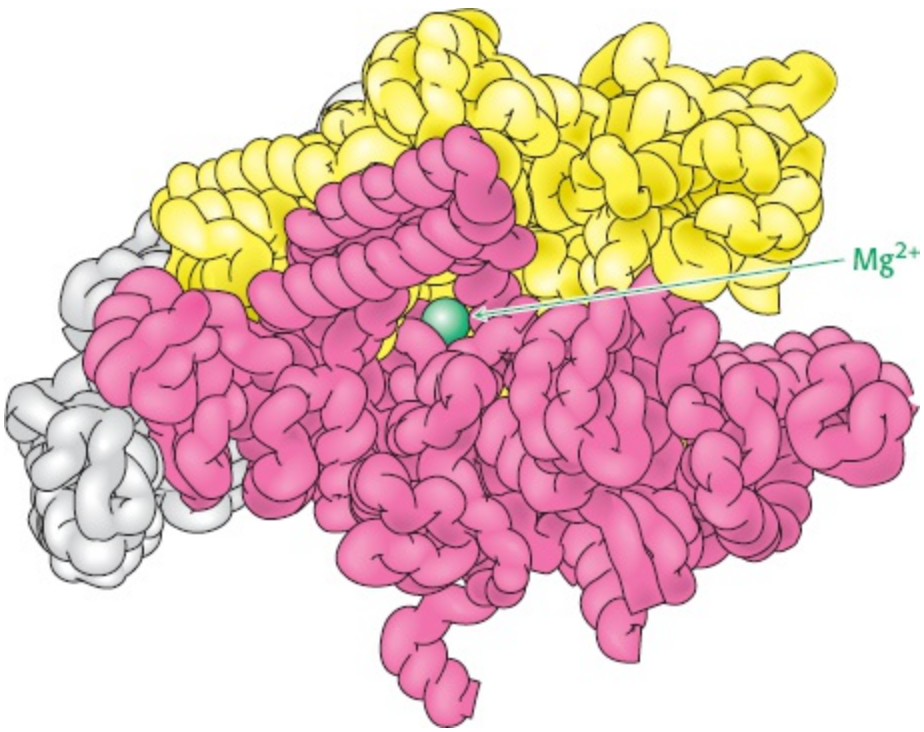


Figura 4.27 RNA polimerase. Esta enzima grande é constituída por diversas subunidades, incluindo a β (vermelho) e a β′ (amarelo), que formam "garras" que mantêm o DNA a ser transcrito. *Observe* que o sítio ativo inclui um íon de Mg^{2+} (verde) no centro da estrutura. Os tubos sinuosos que compõem a proteína na figura representam o arcabouço da cadeia

polipeptídica. [Desenhada a partir de lL9Z.pdb.]

A síntese do RNA é como a do DNA em vários aspectos (Figura 4.28). Primeiramente, a direção da síntese é 5′ → 3′. Em segundo lugar, o mecanismo de alongamento é similar: *o grupo 3′-OH na extremidade da cadeia em crescimento realiza um ataque nucleofílico ao grupo fosforila mais interno do nucleosídio trifosfato que se assoma. Em terceiro lugar, a síntese é estimulada pela hidrólise do pirofosfato. Em contraste com a DNA polimerase, no entanto, a RNA polimerase não precisa de um iniciador. Adicionalmente, a habilidade da RNA polimerase de corrigir erros não é tão extensa quanto a da DNA polimerase.*

Todos os três tipos de RNA celular – mRNA, tRNA e rRNA – são sintetizados na *E. coli* pela mesma RNA polimerase, de acordo com as instruções dadas pelo molde de DNA. Em células de mamíferos, há uma divisão de trabalho entre os diversos tipos de RNA polimerases. Retornaremos a estas RNA polimerases no Capítulo 29.

As RNA polimerases recebem instruções dos moldes de DNA

A RNA polimerase, como as DNA polimerases descritas anteriormente, recebem instruções do molde de DNA. A evidência mais antiga foi que a *composição das bases* do RNA recém-sintetizado é complementar àquela da fita molde de DNA, como exemplificado pelo RNA sintetizado a partir de um molde de DNA de fita única do vírus ϕX174 (Tabela 4.4). Experimentos de hibridização também revelaram que o RNA sintetizado pela RNA polimerase é complementar ao seu molde de DNA. Nestes experimentos, o DNA é desnaturado e sua reassociação é permitida na presença de mRNA. Os híbridos de RNA-DNA se formarão se o RNA e o DNA tiverem sequências complementares. A evidência mais forte para a fidelidade da transcrição veio de pesquisas da sequência de bases. Por exemplo, a sequência de nucleotídios de um segmento de um gene que codifica as enzimas necessárias para a síntese do triptofano foi determinada com o uso de técnicas de sequenciamento de DNA (Seção 5.1). Do mesmo modo, a sequência de mRNA para o gene correspondente foi determinada. Os resultados mostraram que a sequência de RNA é o complemento preciso da sequência molde de DNA (Figura 4.29).

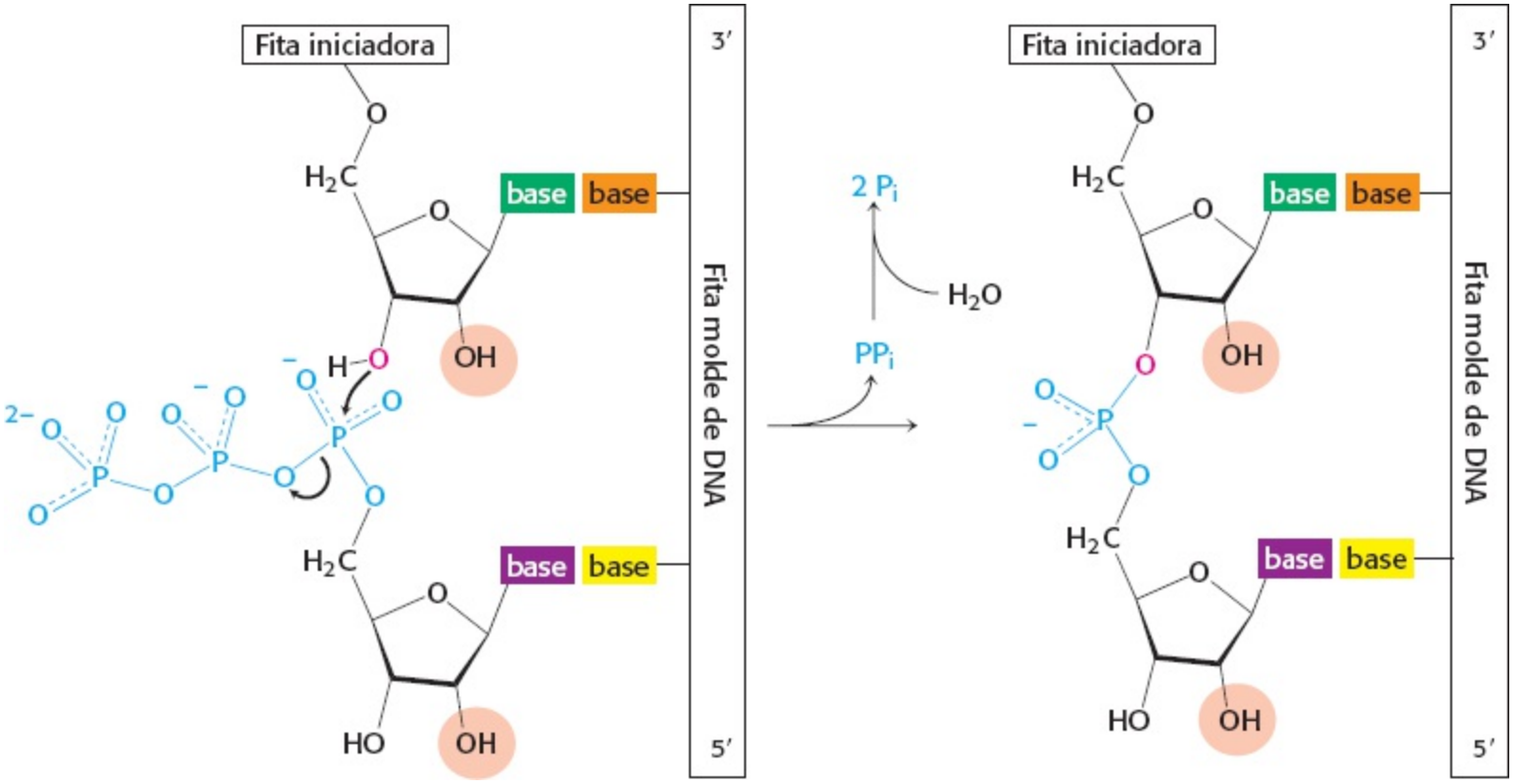


Figura 4.28 Mecanismo de transcrição da reação de alongamento da cadeia, catalisado pela RNA polimerase.

Tabela 4.4 Composição das bases (percentual) de RNA sintetizado a partir de um molde de DNA viral.

Molde de DNA (fita codificante do ϕX174)		RNA produzido	
A	25	U	25
T	33	A	32
G	24	C	23
C	18	G	20

5′—GCGGCGACGCGCAGUUAAUCCCACAGCCGCCAGUUCCGCUGGCGGCAU—3′ **mRNA**
3′—CGCCGCTGCGCGTCAATTAGGGTGTCGGCGGTCAAGGCGACCGCCGTA—5′ **Fita molde de DNA**
5′—GCGGCGACGCGCAGTTAATCCCACAGCCGCCAGTTCCGCTGGCGGCAT—3′ **Fita codificante de DNA**

Figura 4.29 Complementaridade entre o mRNA e o DNA. A sequência de bases do mRNA (vermelho) é o complemento da sequência da fita de DNA molde (azul). A sequência mostrada aqui é do óperon do triptofano, um segmento do DNA que contém os genes para cinco enzimas que catalisam a síntese do triptofano. A outra fita do DNA (preto) é chamada de fita codificante porque tem a mesma sequência do transcrito de RNA, exceto pela timina (T) no lugar da uracila (U).

A transcrição começa próximo às regiões promotoras e encerra-se nas regiões terminadoras

A RNA polimerase tem de detectar e transcrever genes específicos entre vários segmentos de DNA. O que marca o início da unidade a ser transcrita? Os moldes de DNA têm regiões chamadas de *regiões promotoras* que se ligam especificamente à RNA polimerase e determinam onde a transcrição começa. Nas bactérias, duas sequências no lado 5′ antes do primeiro nucleotídio a ser

transcrito funcionam como regiões promotoras (Figura 4.30A). Uma delas, chamada de *caixa de Pribnow*, tem a sequência de consenso TATAAT e é centralizada em –10 (10 nucleotídios no lado 5′ a partir do primeiro nucleotídio transcrito, que é denominado +1). A outra, conhecida como *região –35*, tem uma sequência de consenso TTGACA. O primeiro nucleotídio transcrito é, em geral, uma purina.

Sequência de consenso

Nem todas as sequências das regiões promotoras são idênticas. No entanto, elas têm características em comum, que podem ser representadas por uma sequência consenso idealizada. Cada base na sequência de consenso TATAAT é encontrada na maioria dos promotores procarióticos. Aproximadamente todas as sequências promotoras diferem desta sequência de consenso em apenas uma ou duas bases.

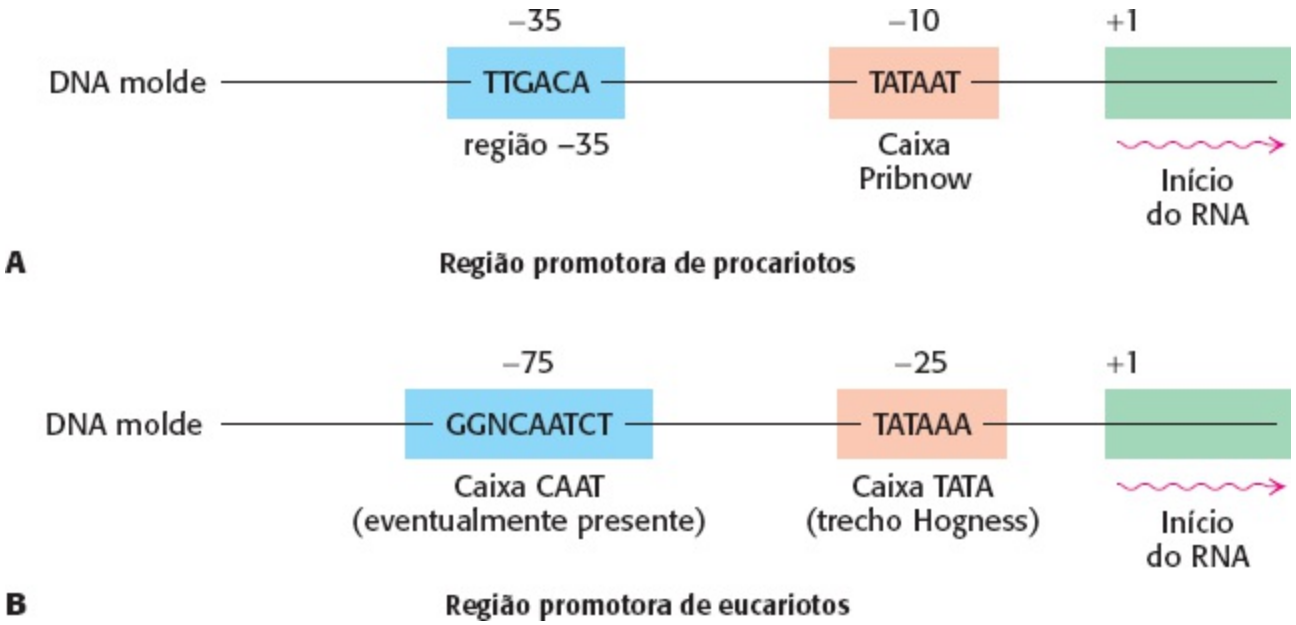


Figura 4.30 Regiões promotoras da transcrição em (A) procariotos e (B) eucariotos. As sequências de consenso são mostradas. O primeiro nucleotídio a ser transcrito é numerado como +1. O nucleotídio adjacente no lado 5′ é numerado –1. As sequências mostradas são as da fita codificante de DNA.

Os genes eucarióticos que codificam proteínas têm regiões promotoras com uma sequência de consenso TATAAA, chamada de *caixa TATA* (*"TATA box"*) ou *caixa de Hogness*, centralizada a aproximadamente –25 (Figura 4.30B). Muitos promotores eucarióticos também têm um *caixa CAAT* com uma sequência de consenso GGNC*AAT*CT centralizada em torno de –75. A transcrição dos genes eucarióticos é adicionalmente favorecida pelas *sequências amplificadoras* (*enhancers*), que podem estar bem distantes (tanto quanto muitas quilobases) do ponto de início, tanto no lado 5′quanto no 3′.

A RNA polimerase continua ao longo do molde de DNA, transcrevendo uma de suas fitas até que sintetize uma sequência de término. Esta sequência codifica um sinal de término, que na *E. coli* é um *grampo de bases pareadas* na molécula recém-sintetizada de RNA (Figura 4.31). Este grampo é formado por pareamento de bases de sequências autocomplementares que são ricas em G e C. O RNA novo espontaneamente se dissocia da RNA polimerase quando o grampo é seguido de um conjunto de resíduos de U. Alternativamente, a síntese de RNA pode ser terminada por ação da *rho*, uma proteína. Sabe-se menos sobre o término da transcrição em eucariotos. Mais detalhes sobre o início e o término da transcrição serão discutidos no Capítulo 29. O importante agora é saber que *pontos específicos para o início e fim da transcrição são codificados no molde de DNA.*

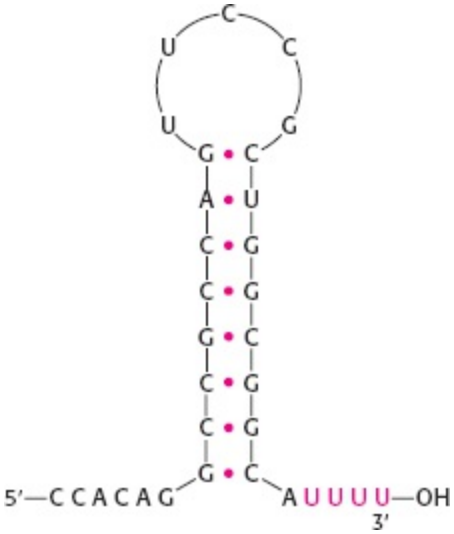


Figura 4.31 Sequência de bases da extremidade 3′ de um transcrito de mRNA na *E. coli*. Uma estrutura em grampo estável é seguida por uma sequência de resíduos de uridina (U).

Nos eucariotos, o RNA mensageiro é modificado após a transcrição (Figura 4.32). Uma estrutura "QUEPE" (CAP) é ligada à extremidade 5′, e uma sequência de adenilatos, a cauda poli(A), é adicionada à extremidade 3′. Estas modificações serão apresentadas em detalhes no Capítulo 29.

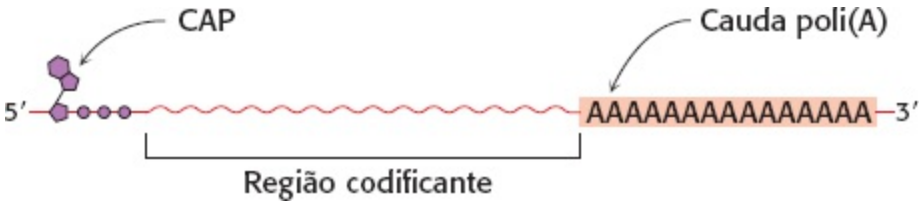


Figura 4.32 Modificação do mRNA. O RNA mensageiro em eucariotos é modificado após a transcrição. Uma estrutura "CAP" nucleotídica é adicionada à extremidade 5′ e uma cauda poli(A) é adicionada à extremidade 3′.

Os RNA transportadores são as moléculas adaptadoras na síntese de proteínas

Vimos que o mRNA é o molde para a síntese de proteínas. Como ele rege os aminoácidos a se unirem na sequência correta para formar uma proteína? Em 1958 Francis Crick escreveu:

> O RNA apresenta, principalmente, uma sequência de regiões onde as pontes de hidrogênios podem ocorrer. Seria esperado, portanto, que qualquer coisa que ocorra no molde de uma maneira *específica* assim o faça formando pontes de hidrogênio. É então uma hipótese natural que o aminoácido seja transportado ao molde por uma molécula adaptadora, e que este adaptador seja a parte que de fato se encaixe ao RNA. Em sua forma mais simples, seriam necessários vinte adaptadores, um para cada aminoácido.

Esta hipótese altamente inovadora se estabeleceu como fato logo depois. *Os adaptadores na síntese de proteínas são os RNA transportadores.* A estrutura e as reações destas moléculas notáveis serão consideradas em detalhes no Capítulo 30. Agora, é suficiente observar que os tRNA contêm uma *região de ligação dos aminoácidos* e uma *região de reconhecimento do molde.* Uma molécula de tRNA transporta um aminoácido específico em sua forma ativada ao local da síntese de proteínas. O grupo carboxila deste aminoácido é esterificado no grupo hidroxila 3′ ou 2′ da unidade de ribose na extremidade 3′ da cadeia do tRNA (Figura 4.33). A união de um aminoácido à molécula de tRNA

para formar um *aminoacil-tRNA* é catalisada por uma enzima específica chamada de *aminoacil-tRNA-sintetase*. Esta reação de esterificação ocorre por meio da quebra de ATP. Há pelo menos uma sintetase específica para cada um dos 20 aminoácidos. A região de reconhecimento do molde no tRNA é uma sequência de três bases chamada de *anticódon* (Figura 4.34). O anticódon do tRNA reconhece a sequência complementar de três bases, chamada de *códon*, no mRNA.

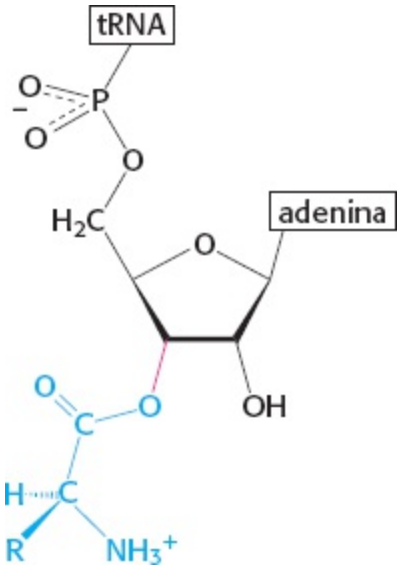


Figura 4.33 Ligação de um aminoácido a uma molécula de tRNA. O aminoácido (mostrado em azul) é esterificado ao grupo hidroxila 3′ do adenilato terminal do tRNA.

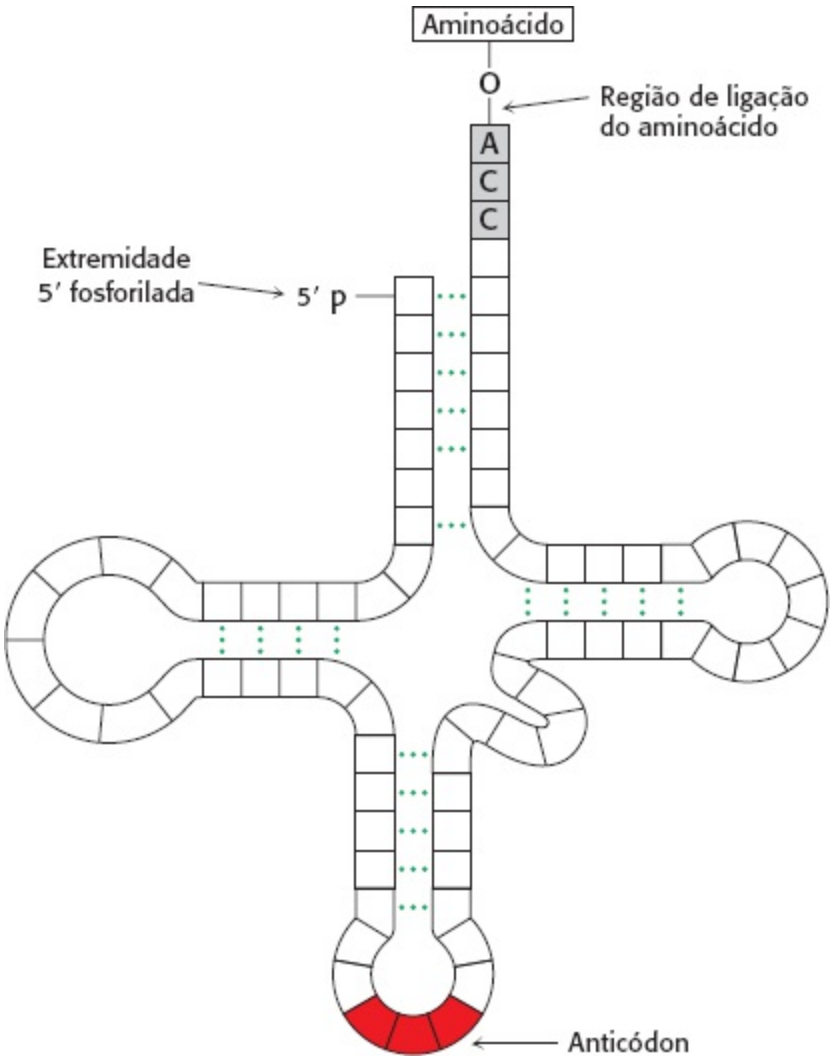


Figura 4.34 Estrutura geral de um aminoacil-tRNA. O aminoácido é ligado à extremidade 3′ do RNA. O anticódon é a região de reconhecimento do molde. *Observe* que o tRNA tem uma estrutura em trevo com muitas pontes de hidrogênio (pontos verdes) entre as bases.

4.6 Os aminoácidos são codificados por grupos de três bases a partir de um ponto inicial fixo

O *código genético* é a relação entre a sequência de bases no DNA (ou seus transcritos de RNA) e a sequência de aminoácidos nas proteínas. Os experimentos de Marshall Nirenberg, Har Gobind Khorana, Francis Crick, Sydney Brenner e outros, estabeleceram as seguintes características do código genético em 1961:

1. Três nucleotídios codificam um aminoácido. As proteínas são construídas a partir de um conjunto básico de 20 aminoácidos, mas há apenas quatro bases. Cálculos simples mostraram que um mínimo de três bases é necessário para codificar pelo menos 20 aminoácidos. Experimentos genéticos mostraram que *um aminoácido é, de fato, codificado por um grupo de três bases, ou códon.*

2. *O código não se sobrepõe*. Considere a sequência de bases ABCDEF. Em um código sobreposto, ABC especifica o primeiro aminoácido, BCD o seguinte, CDE o outro, e assim por diante. Em um código não sobreposto, ABC determina o primeiro aminoácido, DEF o segundo, e assim por diante. Os experimentos genéticos mais uma vez estabeleceram que o código não é sobreposto.

3. *O código não tem pontuação*. A princípio, uma base (mostrada como Q) pode servir como "vírgula" entre grupos de três bases

. . . QABCQDEFQGHIQJKLQ . . .

No entanto, não é este o caso. A*a sequência de bases é lida sequencialmente a partir de um ponto de partida fixo,* sem pontuação.

4. O código genético é degenerado. A maioria dos aminoácidos são codificados por mais de um códon. Há 64 trincas de base possíveis e apenas 20 aminoácidos e, de fato, 61 das 64 trincas possíveis especificam aminoácidos em particular. Três trincas (chamadas de *códons terminais*) designam o fim da tradução. Assim, *para a maioria dos aminoácidos, há mais do que um códon associado.*

Principais características do código genético

Todos os 64 códons foram decifrados (Tabela 4.5). Como o código é altamente degenerado, apenas o triptofano e a metionina são codificados por apenas uma trinca cada. Cada um dos outros 18 aminoácidos é codificado por dois ou mais códons. De fato, a leucina, a arginina e a serina são especificadas por seis códons cada. O número de códons para um aminoácido em particular se correlaciona com sua frequência de ocorrência nas proteínas.

Os códons que especificam os mesmos aminoácidos são chamados de *sinônimos*. Por exemplo, CAU e CAC são sinônimos para a histidina. Observe que os sinônimos não são distribuídos aleatoriamente pelo código genético. Na Tabela 4.5, um aminoácido especificado por dois ou mais

sinônimos ocupa uma única caixa (a menos que seja especificado por mais do que quatro sinônimos). Os aminoácidos em uma caixa são especificados por códons que conservam as duas primeiras bases, mas diferem na terceira, como exemplificado por GUU, GUC, GUA e GUG. Assim, *a maioria dos sinônimos difere apenas na última base da trinca.* A inspeção do código genético mostra que XYC e XYU sempre codificam o mesmo aminoácido, enquanto XYG e XYA geralmente codificam o mesmo aminoácido. A base estrutural para estas equivalências se tornará evidente quando considerarmos a natureza dos anticódons das moléculas de tRNA (Seção 30.3).

Qual o significado biológico da extensa degeneração do código genético? Se o código não fosse degenerado, 20 códons designariam os aminoácidos e 44 levariam ao término da cadeia. A probabilidade de uma mutação que levasse ao fim da cadeia seria, portanto, muito maior com um código não degenerado. As mutações finalizadoras das cadeias geralmente à inativação de proteínas, enquanto substituições de aminoácidos por outros normalmente são relativamente inofensivas. Além disso, o código é feito de modo que uma mudança em qualquer base de um códon resulta em um sinônimo ou em um aminoácido com propriedades químicas similares. Deste modo, *a degeneração minimiza os efeitos deletérios das mutações.*

Tabela 4.5 O código genético.

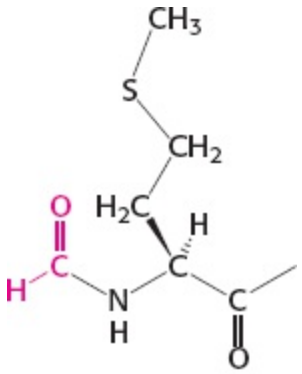
	Segunda posição				
Primeira posição (extremidade 5')	U	C	A	G	Terceira posição (extremidade 3')
U	Phe	Ser	Tyr	Cis	U
	Phe	Ser	Tyr	Cis	C
	Leu	Ser	Terminação	Terminação	A
	Leu	Ser	Terminação	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lis	Arg	A
	Met	Thr	Lis	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C

	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Nota: Esta tabela identifica o aminoácido codificado por cada trinca. Por exemplo, o códon 5′-AUG-3′ no mRNA especifica a metionina, enquanto o códon CAU especifica a histidina. UAA, UAG e UGA são sinais de término. AUG é parte do sinal de iniciação, além de codificar resíduos internos de metionina.

O RNA mensageiro contém sinais de início e fim para a síntese de proteínas

O RNA mensageiro é traduzido em proteínas nos *ribossomos* – grandes complexos moleculares compostos de proteínas e RNA ribossômico. Como o mRNA é interpretado pelo aparato de tradução? O sinal de início da síntese de proteínas é complexo em bactérias. As cadeias polipeptídicas em bactérias iniciam com um aminoácido modificado – a formilmetionina (fMet). Um tRNA específico, o tRNA iniciador, transporta a fMet. Esta fMet-tRNA reconhece o códon AUG ou, menos frequentemente, GUG. No entanto, o AUG também é códon para um resíduo interno de metionina, e o GUG é o códon para um resíduo interno de valina. Assim, em procariotos, o sinal para o primeiro aminoácido em todas as cadeias polipeptídicas deve ser mais complexo do que para os aminoácidos subsequentes. *AUG (ou GUG) é apenas parte do sinal de iniciação* (Figura 4.35). Nas bactérias, o códon iniciador AUG (ou GUG) é precedido por uma sequência rica em purina, a muitos nucleotídios de distância, chamada de *sequência Shine-Dalgarno*, que faz pares de base com uma sequência complementar na molécula de RNA ribossômico (Seção 30.3). Em eucariotos, o AUG mais próximo da extremidade 5′ de uma molécula de mRNA é geralmente o sinal de iniciação para a síntese de proteínas. Este AUG em particular é lido por um tRNA iniciador conjugado a uma metionina. Após a localização deste AUG iniciador, a *fase de leitura* é estabelecida – grupos de três nucleotídios não sobrepostos são definidos, começando com o códon iniciador AUG.



fMet

Como já mencionado, *UAA, UAG e UGA designam a terminação da cadeia.* Estes códons não são lidos por moléculas de tRNA, e sim por proteínas específicas chamadas de *fatores de liberação* (Seção 30.3). A ligação de um fator de liberação ao ribossomo libera a proteína recém-sintetizada.

O código genético é quase universal

O código genético é o mesmo em todos os organismos? Esta questão foi respondida por meio da análise da sequência de bases de muitos genes selvagens e mutantes, assim como das sequências de

aminoácidos e suas proteínas codificadas. Para cada mutante, a mudança de nucleotídio nos genes leva a uma mudança no aminoácido, como previsto pelo código genético. Além disso, os mRNA podem ser corretamente traduzidos corretamente pelo maquinário de síntese proteica de várias espécies diferentes. Por exemplo, o mRNA da hemoglobina humana é corretamente traduzido pelo extrato de germe de trigo, e bactérias expressam eficientemente moléculas recombinantes de DNA que codificam proteínas humanas como a insulina. Estes resultados experimentais sugeriram fortemente que o código genético é universal.

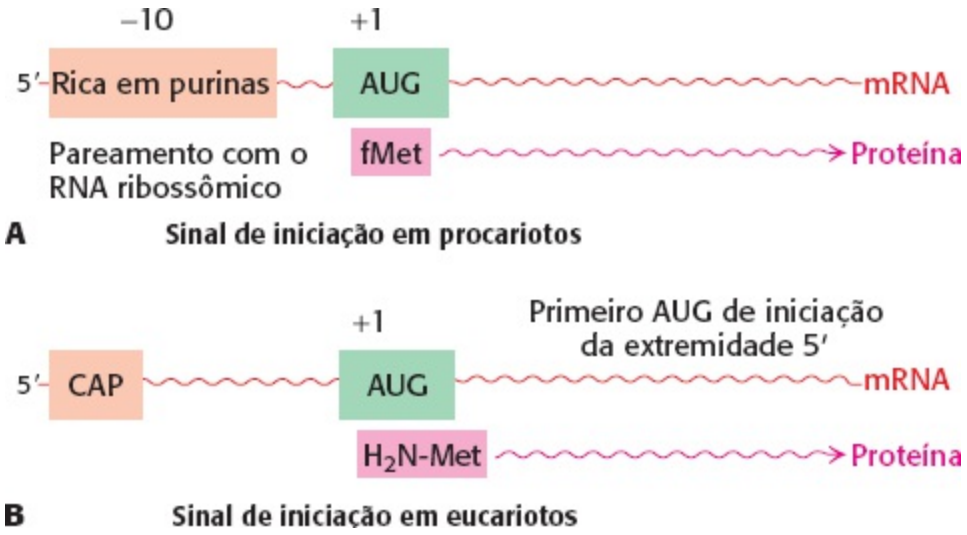


Figura 4.35 Início da síntese proteica. Os sinais de iniciação são necessários para começar a síntese de proteínas em (**A**) procariontes e (**B**) eucariontes.

Uma surpresa foi encontrada quando a sequência do DNA mitocondrial humano se tornou conhecida. Os ribossomos leem UGA na mitocôndria humana como um códon para o triptofano, em vez de lê-lo como sinal de término (Tabela 4.6). Além disso, AGA e AGG são lidos como sinais de término, e não como códons para a arginina, e AUA é lido como códon para a metionina, e não para a isoleucina. As mitocôndrias de outras espécies, como aquelas da levedura, também têm códigos genéticos que diferem ligeiramente do código padrão. O código genético da mitocôndria pode ser diferente daquele do resto da célula porque o DNA mitocondrial codifica um conjunto diferente de tRNA. Será que algum sistema de síntese proteica celular se diferencia do código genético padrão? Pelo menos 16 organismos apresentam diferenças em relação ao código genético padrão. Protozoários ciliados diferem da maioria dos organismos na leitura de UAA e UAG como códons para aminoácidos, em vez de sinais de término; UGA é seu único sinal de terminação. Assim, *o código genético é quase, mas não absolutamente, universal.* Variações claramente existem em mitocôndrias e em outras espécies, como os ciliados, que divergiram bem cedo na evolução eucariótica. É interessante observar que duas das novas relações dos códons na mitocôndria humana diminuem o conteúdo da informação da terceira base da trinca. Por exemplo, no código genético comum, somente AUG codifica a metionina enquanto AUA é o códon da isoleucina. No entanto, na mitocôndria humana, tanto AUA quanto AUG especificam a metionina. A maioria das variações do código genético padrão é direcionada a códigos mais simples.

Por que o código permaneceu quase invariável ao longo de bilhões de anos de evolução, das bactérias aos seres humanos? Uma mutação que alterou a leitura do mRNA mudaria a sequência de aminoácidos da maioria, senão de todas, as proteínas sintetizadas por um organismo em particular.

Muitas dessas mudanças seriam indubitavelmente deletérias e assim haveria uma forte seleção contra uma mutação com consequências tão penetrantes.

Tabela 4.6 Códons diferentes na mitocôndria humana.

Códon	Código padrão	Código mitocondrial
UGA	Terminação	Trp
UGG	Trp	Trp
AUA	Ile	Met
AUG	Met	Met
AGA	Arg	Terminação
AGG	Arg	Terminação

4.7 A maioria dos genes eucarióticos é um mosaico de íntrons e éxons

Nas bactérias, as cadeias polipeptídicas são codificadas por um conjunto contínuo de trincas de códons no DNA. Por muitos anos assumiu-se que os genes de organismos superiores também eram contínuos; a sequência de DNA que codifica um gene tinha um início e um fim específicos com nenhuma outra sequência de DNA não codificante interrompendo. Esta ideia foi inesperadamente descartada em 1977, quando pesquisadores, incluindo Philip Sharp e Richard Roberts, descobriram que muitos genes são *descontínuos*. A natureza em mosaico dos genes eucarióticos foi revelada por estudos de microscopia eletrônica de híbridos formados entre o mRNA e o segmento do DNA contendo o gene correspondente (Figura 4.36). Por exemplo, o gene da cadeia β da hemoglobina, sua sequência codificante de aminoácido é interrompida por um longo *íntron* de 550 pares de base e outro pequeno, com 120 pares de base. Assim, o *gene para a β-globina é dividido em três sequências codificantes* (Figura 4.37). A média dos genes humanos têm 8 íntrons; alguns têm mais de 100. Os tamanhos variam de 50 a 10.000 nucleotídios.

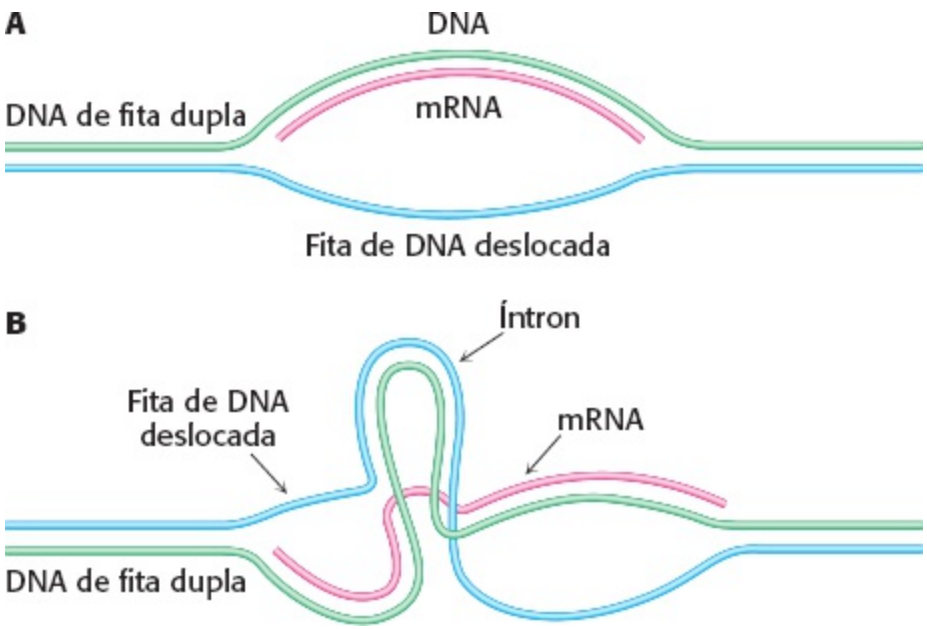


Figura 4.36 Detecção de íntrons por microscopia eletrônica. Uma molécula de mRNA (mostrada em vermelho) é hibridizada com o DNA genômico contendo o gene correspondente. **A.** Uma volta simples do DNA de fita única (mostrada em azul) é vista quando o gene é contínuo. **B.** Duas voltas do DNA de fita única (azul) e uma volta de DNA de fita dupla (azul e verde) são vistas quando o gene contém um íntron. Voltas adicionais são evidentes quando mais de um íntron está presente.

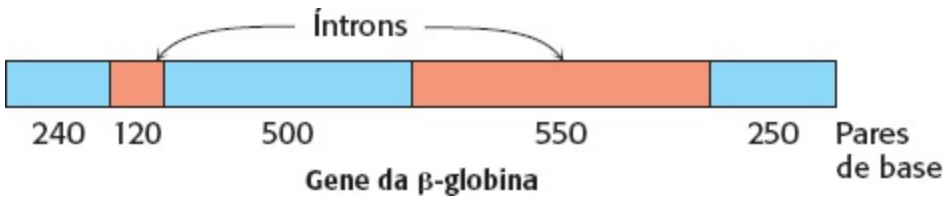


Figura 4.37 Estrutura do gene da β-globina.

O processamento do RNA gera o RNA maduro

Em qual estágio da expressão gênica os íntrons são removidos? As cadeias de RNA recém-sintetizadas (pré-mRNA ou transcrito primário) isoladas de núcleos são muito maiores que as moléculas de mRNA derivadas deles; em relação ao RNA da β-globina, o primeiro contém aproximadamente 1.600 nucleotídios e o último, aproximadamente 900. De fato, o transcrito primário do gene da β-globina contém duas regiões que não estão presentes no mRNA. *Estas regiões no transcrito primário são removidas, e as sequências codificantes são ligadas simultaneamente por uma enzima de splicing, para formar o mRNA maduro* (Figura 4.38). As regiões que são removidas do transcrito primário são chamadas de *íntrons* (de *sequências intervenientes*), enquanto aquelas que são mantidas no mRNA maduro são chamadas de *éxons* (de sequências *ex*pressas). Uma característica em comum na expressão dos genes descontínuos, ou divididos, é que seus éxons são ordenados na mesma sequência no mRNA e no DNA. Assim, os códons nos genes divididos, assim como nos genes contínuos, estão na mesma ordem que os aminoácidos nos produtos polipeptídicos.

O *splicing* é uma operação complexa que é realizada por *spliceossomos*, que são conjuntos de proteínas e moléculas de RNA pequeno. O RNA tem um papel catalítico (Seção 29.3). Este maquinário enzimático reconhece sinais no RNA nascente que especifica as regiões de corte (*splicing*). *Os íntrons quase sempre se iniciam com um GU ou com um AG que é precedido por uma sequência rica em pirimidinas* (Figura 4.39). *Esta sequência de consenso é parte do sinal para o*

splicing.

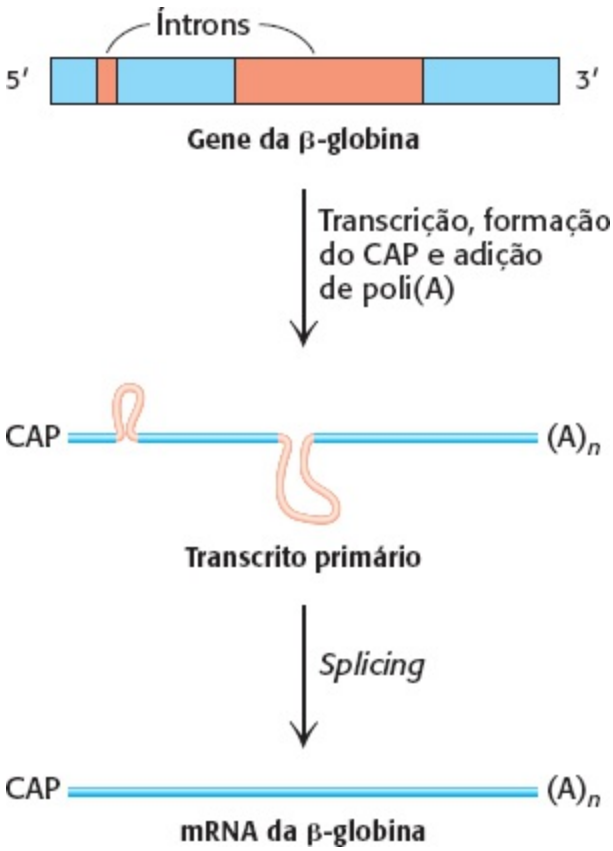


Figura 4.38 Transcrição e processamento do gene da β-globina. O gene é transcrito para gerar o transcrito primário, o qual é modificado por meio da adição do CAP e da cauda poli(A). Os íntrons no transcrito primário de RNA são removidos para formar o mRNA.

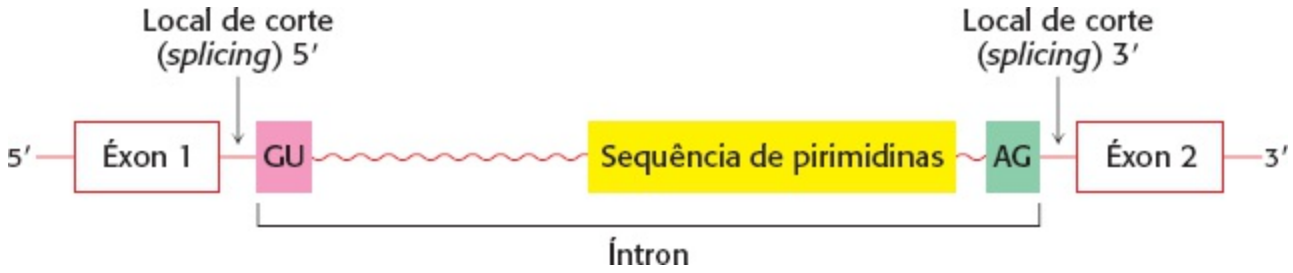


Figura 4.39 Sequência de consenso para o *splicing* dos precursores de mRNA.

Muitos éxons codificam domínios de proteínas

A maioria dos genes de eucariotos superiores, como aves e mamíferos, é dividida. Eucariotos inferiores, no entanto, como as leveduras, têm uma proporção muito maior de genes contínuos. Em procariotos, os genes divididos são extremamente raros. Será que os íntrons foram introduzidos nos genes ao longo da evolução dos organismos superiores? Ou os íntrons foram removidos dos genes para formar os genomas lineares dos procariotos e dos eucariotos mais simples? As comparações de sequências de DNA dos genes que codificam proteínas, que são altamente conservados ao longo da evolução, sugerem que *os íntrons estavam presentes nos genes ancestrais e foram perdidos ao longo da evolução dos organismos que se aperfeiçoaram para o crescimento rápido, como os procariontes*. As posições dos íntrons em alguns genes têm pelo menos 1 bilhão de anos de idade. Além disso, um mecanismo comum de *splicing* foi desenvolvido antes da divergência dos fungos,

plantas e vertebrados, como foi mostrado pelas evidências de que extratos de células de mamíferos podem realizar *splicing* em RNA de leveduras.

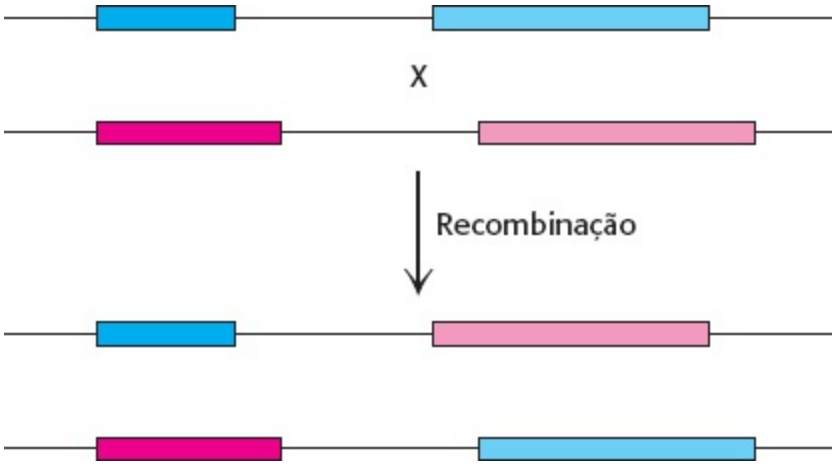


Figura 4.40 Reorganização de éxons. Os éxons podem ser prontamente reorganizados pela recombinação do DNA para expandir o repertório genético.

Que vantagens os genes divididos podem oferecer? *Muitos éxons codificam unidades estruturais e funcionais sutis das proteínas.* Uma hipótese interessante é que *novas proteínas surgiram na evolução por meio da reorganização de éxons que codificavam elementos estruturais sutis, sítios de ligação e sítios catalíticos*, em um processo chamado de *reorganização de éxons.* Como ele preserva as unidades funcionais, mas permite que elas interajam de novas maneiras, a reorganização de éxons é uma rápida e eficiente maneira de gerar novos genes (Figura 4.40). Os íntrons são extensas regiões nas quais o DNA pode se quebrar e recombinar sem efeito deletério nas proteínas codificadas. De modo contrário, a troca de sequências entre éxons diferentes em geral leva à perda de função.

Outra vantagem dos genes divididos é o potencial para a geração de uma série de proteínas relacionas por meio do splicing *de um transcrito de RNA de formas diferentes.* Por exemplo, o precursor de uma célula produtora de anticorpos forma um anticorpo que é ancorado à membrana plasmática da célula (Figura 4.41). O anticorpo ancorado reconhece um antígeno externo específico, em um evento que leva a célula à diferenciação e proliferação. A célula produtora de anticorpos ativada pode então realizar o *splicing* do RNA de uma maneira diferente para formar moléculas de anticorpos solúveis que são secretadas, em vez de ancoradas na superfície celular. Vemos aqui um claro exemplo de um benefício conferido pela complexa organização de íntrons e éxons em organismos superiores. *O splicing alternativo é um meio prático de formar um conjunto de proteínas que são variações de um tema básico, de acordo com um programa de desenvolvimento, sem que seja necessário um gene para cada proteína.*

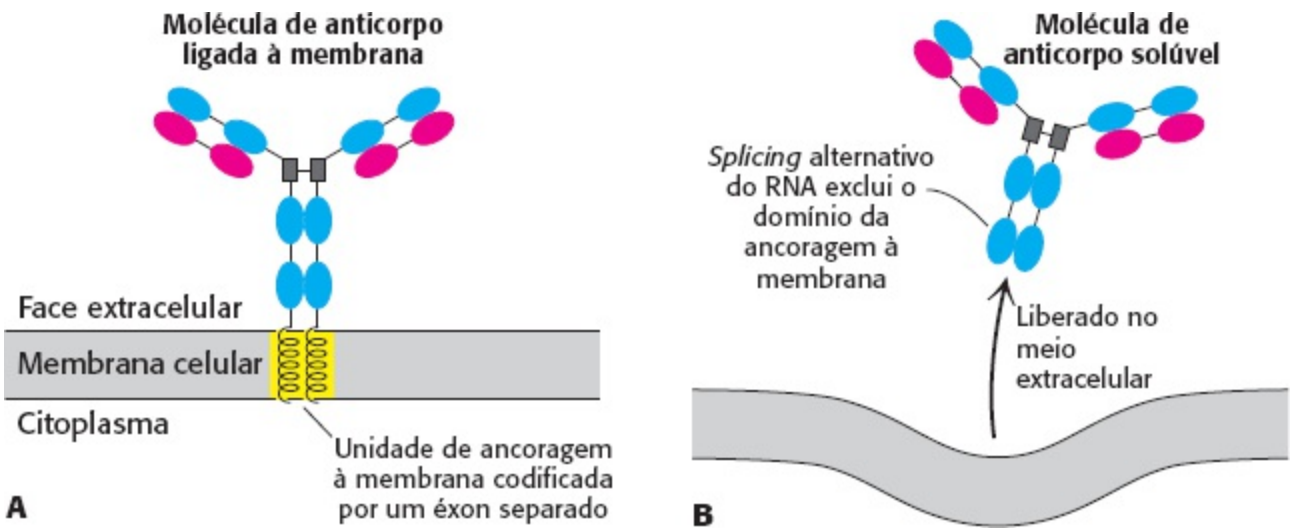


Figura 4.41 *Splicing* alternativo. *Splicing* alternativos geram mRNA que são moldes para diferentes formas de uma proteína: **A** um anticorpo ligado à membrana na superfície de um linfócito e (**B**) sua versão solúvel, exportada da célula. O anticorpo ligado à membrana é ancorado à célula por um segmento em hélice (destacado em amarelo) que é codificado por seu próprio éxon.

Resumo

4.1 Um ácido nucleico consiste em quatro tipos de bases ligadas a um arcabouço de ose-fosfato

O DNA e o RNA são polímeros lineares de um número limitado de monômeros. No DNA as unidades repetitivas são nucleotídios, com a desoxirribose como ose e a adenina (A), a timina (T), a guanina (G) e a citosina (C) como bases. No RNA a ose é a ribose e a base uracila (U) é usada em lugar da timina. O DNA é a molécula da hereditariedade em todos os organismos procariontes e eucariontes. Nos vírus, o material genético é o DNA ou o RNA.

4.2 Um par de cadeias de ácidos nucleicos com sequências complementares pode formar uma estrutura em dupla hélice

Todo o DNA celular consiste em duas cadeias de polinucleotídios muito longas em hélice, enroladas em torno de um eixo comum. O arcabouço de ose-fosfato de cada fita reside no exterior da dupla hélice, enquanto as bases purínicas e pirimidínicas estão no interior. As duas cadeias são unidas por meio de pontes de hidrogênio entre os pares de bases: a adenina sempre pareia com a timina e a guanina sempre pareia com a citosina. De fato, uma fita de uma dupla hélice é o complemento da outra. As duas fitas da dupla hélice se dispõem em direções opostas. A informação genética é codificada pela sequência precisa de bases ao longo da fita.

O DNA é uma molécula estruturalmente dinâmica que pode existir em uma variedade de formas helicoidais: A-DNA, B-DNA (a clássica hélice de Watson-Crick) e Z-DNA. Nestas formas, duas cadeias antiparalelas são unidas por pares de bases Watson-Crick e interações de empilhamento entre as bases da mesma fita. A-DNA e B-DNA são hélices com sentido horário. No B-DNA os pares de bases são aproximadamente perpendiculares ao eixo da hélice. O Z-DNA é uma hélice com sentido anti-horário. A maior parte do DNA de uma célula está na forma B.

O DNA de fita dupla pode se enrolar em torno de si mesmo para formar uma estrutura em

super-hélice. A superespirilização do DNA tem duas consequências importantes. A superespirilização compacta o DNA e, como o DNA em super-hélice é parcialmente inseparável, é mais acessível para interações com outras biomoléculas.

Os ácidos nucleicos de fita única, mais notavelmente o RNA, podem formar estruturas tridimensionais complicadas, que contêm extensas regiões em dupla hélice, originárias de dobramentos da cadeia em grampos.

4.3 A dupla hélice facilita a transmissão precisa da informação hereditária

A natureza estrutural da dupla hélice prontamente explica a exata replicação do material genético, uma vez que a sequência de bases de uma fita determina a sequência de bases da outra fita. Na replicação, as fitas da hélice se separam e uma nova fita, complementar a cada uma das originais, é sintetizada. Assim, duas novas hélices são geradas, cada uma composta de uma fita da molécula original e outra fita recém-sintetizada. Este modo de replicação é chamado de semiconservativo porque cada nova hélice mantém uma das fitas originais.

Para que a replicação ocorra, as fitas da dupla hélice devem se separar. *In vitro*, o aquecimento do DNA de dupla hélice separa as fitas, em um processo chamado de desnaturação. Na célula, proteínas especiais temporariamente separam as fitas na replicação.

4.4 O DNA é replicado por polimerases que recebem instruções de moldes

Na replicação do DNA, as duas fitas da dupla hélice se desenrolam e se separam à medida que novas cadeias são sintetizadas. Cada fita parental atua como um molde para a formação da nova fita complementar. A replicação do DNA é um processo complexo executado por muitas proteínas, incluindo diversas DNA polimerases. Os precursores ativados na síntese de DNA são os quatro desoxirribonucleotídios 5′-trifosfatos. A nova fita é sintetizada na direção 5′ → 3′ por meio de um ataque nucleofílico da hidroxila da extremidade 3′ da fita iniciadora ao átomo de fósforo mais interno do desoxirribonucleotídio que se acerca. Muito importante, as DNA polimerases catalisam as formação de ligações fosfodiéster apenas se a base do nucleotídio que chega for complementar à base da fita molde. Noutras palavras, as DNA polimerases são enzimas dirigidas por moldes. Os genes de alguns vírus, como o vírus mosaico do tabaco, são feitos de RNA de fita única. Uma RNA polimerase dirigida por RNA medeia a replicação deste RNA viral. Retrovírus, exemplificados pelo HIV-1, têm um genoma de RNA de fita única que sofre transcrição reversa em DNA de fita dupla por meio da transcriptase reversa, uma DNA polimerase dirigida a RNA.

4.5 A expressão gênica é a transformação da informação do DNA em moléculas funcionais

O fluxo da informação genética em células normais é do DNA para o RNA e para a proteína. A síntese de RNA a partir de um molde de DNA é chamada de transcrição, enquanto a síntese de uma proteína a partir de um molde de RNA é chamada de tradução. As células contêm diversos tipos de RNA, entre os quais estão o RNA mensageiro (mRNA), RNA transportador (tRNA) e RNA ribossômico (rRNA), que variam de tamanho de 75 a mais de 5.000 nucleotídios. Todo o RNA celular é sintetizado por RNA polimerases, de acordo com instruções dadas pelos moldes de DNA. Os intermediários ativados são ribonucleosídios trifosfatos e a direção da síntese,

como a do DNA, é 5′ → 3′. As RNA polimerases diferem das DNA polimerases por não necessitarem de um iniciador.

4.6 Os aminoácidos são codificados por grupos de três bases a partir de um ponto inicial

O código genético é a relação entre a sequência de bases no DNA (ou seu transcrito de RNA) e a sequência de aminoácidos nas proteínas. Os aminoácidos são codificados por grupos de três bases (chamados de códons), iniciando a partir de um ponto fixo. Sessenta e um dos 64 códons especificam um aminoácido em particular, enquanto os outros 3 códons (UAA, UAG e UGA) são sinais para a terminação da cadeia. Assim, para a maioria dos aminoácidos, há mais de um códon que o codifica. Em outras palavras, o código é degenerado. O código genético é quase o mesmo para todos os organismos. Os mRNA naturais contêm sinais de iniciação e terminação da tradução, assim como os genes o contêm para controlar onde a transcrição inicia e termina.

4.7 A maioria dos genes eucarióticos é um mosaico de íntrons e éxons

A maioria dos genes de eucariotos superiores é descontínua. As sequências codificantes nestes genes divididos, chamadas de éxons, são separadas por sequências não codificantes, chamadas de íntrons, que são removidos na conversão do transcrito primário para o mRNA e outras moléculas funcionais de RNA maduro. Genes divididos, assim como os contínuos, são colineares com seus produtos peptídicos. Uma característica marcante de muitos éxons é que eles codificam domínios funcionais de proteínas. Novas proteínas provavelmente surgiram, ao longo do curso da evolução, pela reorganização dos éxons. Os íntrons podem ter estado presentes nos genes primordiais, mas foram perdidos ao longo da evolução de organismos de crescimento rápido como bactérias e leveduras.

Palavras-chave

ácido desoxirribonucleico (DNA) (p. 112)
ácido ribonucleico (RNA) (p. 113)
A-DNA (p. 117)
anticódon (p. 130)
B-DNA (p. 117)
código genético (p. 130)
códon (p. 130)
desoxirribose (p. 112)
DNA polimerase (p. 123)
dupla hélice (p. 111)
éxon (p. 134)
iniciador (p. 123)
íntron (p. 134)
micro RNA (miRNA) (p. 126)
molde (p. 123)
nucleosídio (p. 113)
nucleotídio (p. 113)
pirimidina (p. 113)
purina (p. 113)

região promotora (p. 128)
reorganização de éxons (p. 135)
replicação semiconservativa (p. 120)
ribose (p. 112)
ribossomo (p. 132)
RNA mensageiro (mRNA) (p. 125)
RNA nuclear pequeno (snRNA) (p. 126)
pequeno RNA de interferência (siRNA) (p. 126)
RNA polimerase (p. 126)
RNA ribossômico (rRNA) (p. 126)
RNA transportador (tRNA) (p. 126)
sequência Shine-Dalgarno (p. 132)
spliceossomo (p. 134)
splicing (p. 134)
splicing alternativo (p. 135)
tradução (p. 125)
transcriptase reversa (p. 124)
transcrição (p. 126)
Z-DNA (p. 118)

Questões

1. *Um t no lugar de s?* Diferencie um nucleosídio de um nucleotídio.

2. *Um par amável.* O que é um pareamento de bases Watson-Crick?

3. *Chargaff manda!* O bioquímico Erwin Chargaff foi o primeiro a perceber que, no DNA, [A] = [T] e [G] = [C], equilíbrios hoje chamados de regra de Chargraff. Usando esta regra, determine as porcentagens de todas as bases em um DNA com 20% de timina.

4. *Mas nem sempre.* Uma fita única de RNA tem 20% de U. O que você pode predizer sobre as porcentagens das bases restantes?

5. *Complementos.* Escreva a sequência complementar (na notação 5′ → 3′ padrão) para (a) GATCAA; (b) TCGAAC, (c) ACGCGT e (d) TACCAT.

6. *Restrições de composição.* A composição (em unidades de fração-mole) de uma das fitas de uma molécula de DNA de dupla hélice é [A] = 0,30 e [G] = 0,24. (a) O que você pode dizer sobre [T] e [C] da mesma fita? (b) O que você pode dizer sobre [A], [G], [T] e [C] da fita complementar?

7. *O tamanho importa.* Por que GC e AT são os únicos pares possíveis na dupla hélice?

8. *Forte, mas não o suficiente.* Por que o calor desnatura o DNA em solução?

9. *Único*. O genoma humano contém 3 bilhões de nucleotídios organizados em um vasto conjunto de sequências. Qual o comprimento mínimo de uma sequência de DNA que, em toda probabilidade, aparecerá uma vez apenas no genoma humano? Você deve considerar apenas uma fita e pode assumir que os quatro nucleotídios têm a mesma probabilidade de ocorrência.

10. *Indo e vindo*. O que significa dizer que as cadeias de DNA em uma dupla hélice têm polaridades opostas?

11. *Todos por um*. Se as forças – pontes de hidrogênio e forças de empilhamento – que mantêm junta a hélice são fracas, por que é difícil romper a dupla hélice?

12. *Sobrecarregado*. O DNA na forma de dupla hélice deve estar associado a cátions, em geral o Mg^{+2}. Qual a razão desta demanda?

13. *Não necessariamente de A a Z*. Descreva as três formas que a dupla hélice pode assumir.

14. *DNA perdido*. O DNA de uma mutação de deleção de um bacteriófago λ tem um comprimento de 15 μm, em vez de 17 μm. Quantos pares de base estão faltando neste mutante?

15. *Um padrão não visto.* Que resultado Meselson e Stahl deveriam ter obtido se a replicação do DNA fosse conservativa (ou seja, a dupla hélice parental se mantivesse unida)? Dê a distribuição esperada das moléculas de DNA após 1,0 e 2,0 gerações para a replicação conservativa.

16. *Marcando o DNA*. (a) Suponha que você queira marcar radioativamente o DNA, mas não o RNA, em bactérias em divisão e crescimento. Qual molécula radioativa você adicionaria ao meio de cultura? (b) Suponha que você queira preparar o DNA no qual o arcabouço dos átomos de fósforo sejam uniformemente marcados com ^{32}P. Quais precursores devem ser adicionais à solução contendo a DNA polimerase e o molde de DNA com iniciador? Especifique a posição dos átomos radioativos nestes precursores.

17. *Encontrando um molde*. Uma solução contém DNA polimerase e sais de Mg^{2+} de dATP, dGTP, dCTP e TTP. As seguintes moléculas de DNA foram adicionadas a alíquotas desta solução. Qual delas levaria à síntese de DNA? (a) Um círculo fechado de fita única contendo 1.000 unidades de nucleotídios. (b) Um círculo fechado de dupla fita contendo 1.000 pares de nucleotídios. (c) Um círculo de fita única de 1.000 nucleotídios pareados com uma fita linear de 500 nucleotídios com uma extremidade 3′-OH livre. (d) Uma molécula linear de fita dupla com 1.000 pares de nucleotídios com um grupo 3′-OH livre em cada extremidade.

18. *Retrógrado*. O que é um retrovírus e como o fluxo de informação em um retrovírus é diferente daquele de uma célula infectada?

19. *O começo correto*. Suponha que você queira fazer um ensaio da atividade da transcriptase reversa. Se o polirriboadenilato é o molde do ensaio, o que você deve usar como iniciador? Qual nucleotídio radioativo você deveria usar para acompanhar o alongamento da cadeia?

20. *Degradação essencial*. A transcriptase reversa tem atividade de ribonuclease, assim como atividade de polimerase. Qual o papel de sua atividade de ribonuclease?

21. *Caçada ao vírus*. Você purificou um vírus que infecta folhas de nabo. O tratamento da amostra com fenol remove as proteínas virais. A aplicação do material residual a folhas raspadas acarreta a formação de uma progênie de vírus. Você infere que a substância infectante é um ácido nucleico. Proponha um meio simples e altamente sensível para determinar se o ácido nucleico infeccioso é um DNA ou RNA.

22. *Consequências mutagênicas.* A desaminação espontânea das bases citosina no DNA ocorre em uma frequência baixa, mas mensurável. A citosina é convertida em uracila pela perda de seu grupo amino. Após esta conversão, qual par de bases ocupa a posição em cada uma das fitas filhas

resultantes de uma etapa de replicação? E duas etapas de replicação?

23. *Conteúdo da informação.* (a) Quantas sequências diferentes de 8-mer de DNA existem? (Dica: há 16 dinucleotídios e 64 trinucleotídios possíveis.) Podemos quantificar a capacidade de transporte de informação dos ácidos nucleicos da seguinte maneira. Cada posição pode ser uma de quatro bases, correspondendo a dois bits de informação ($2^2 = 4$). Assim, uma cadeia com 5.100 nucleotídios corresponde a $2 \times 5.100 = 10.200$ bits, ou 1.275 bytes (1 byte = 8 bits). (b) Quantos bits de informação são armazenados em uma sequência de DNA de 8-mer? E no genoma da *E. coli?* E no genoma humano? (c) Compare cada um destes valores com a quantidade de informação que pode ser armazenada em um HD de computador, ou CD (aproximadamente 700 megabytes).

24. *Polimerases-chave.* Compare a DNA polimerase e a RNA polimerase da *E. coli* em relação às seguintes características: (a) precursores ativados, (b) direção do alongamento da cadeia, (c) conservação do molde e (d) necessidade de um iniciador.

25. *Semelhança familiar.* Diferencie entre o mRNA, rRNA e o tRNA.

26. *Sequências codificadas.* (a) Escreva a sequência da molécula de mRNA sintetizada de uma fita molde de DNA com a seguinte sequência:

5′- ATCGTACCGTTA- 3′

(b) Qual a sequência de aminoácidos codificada pela seguinte sequência de bases em uma molécula de mRNA? Assuma que a leitura inicia na extremidade 5′.

5′-UUGCCUAGUGAUUGGAUG-3′

(c) Qual a sequência de um polipeptídio formado pela adição de um poli(UUAC) a um sistema sintético de síntese de proteínas?

27. *Uma cadeia mais forte.* O RNA é rapidamente hidrolisado por álcali, enquanto o DNA não. Por quê?

28. *Uma imagem vale mil palavras.* Escreva uma sequência de reações mostrando por que o RNA é mais suscetível a um ataque nucleofílico que o DNA.

29. *Fluxo de informação.* O que significa expressão gênica?

30. *Podemos concordar.* O que é uma sequência consenso?

31. *Um bloqueador potente.* Como a cordicepina (3′-desoxiadenosina) bloqueia a síntese de DNA?

32. *RNA silencioso.* A trinca GCC não pode ser decifrada da mesma forma que UUU, CCC e AAA porque o poli(G) não age como um molde. O poli(G) forma uma estrutura em tripla hélice. Por que ele é um molde ineficaz?

33. *Talvez não seja tão ruim.* O que quer dizer degeneração do código genético?

34. *Na verdade, pode até ser bom.* Qual o benefício biológico da degeneração do código genético?

35. *Associação.* Associe os componentes da coluna da direita com o processo apropriado na coluna esquerda.

(a) Replicação _____

(b) Transcrição _____

(c) Tradução _____

1. RNA polimerase

2. DNA polimerase

3. Ribossomo

4. dNTP

5. tRNA

6. NTP

7. mRNA

8. iniciador

9. rRNA

10. promotor

36. *Uma competição vigorosa.* Associe os componentes da coluna da direita com o processo apropriado na coluna da esquerda.

(a) fMet

(b) Shine-Dalgarno

(c) íntron

(d) éxon

(e) pré-mRNA

(f) mRNA

(g) spliceossomo

1. mensagem contínua

2. removido

3. o primeiro de muitos

4. que une

5. unido

6. localizar o início

7. mensagem descontínua

37. *Dois por um.* Moléculas sintéticas de RNA de sequência definida são instrumentais no deciframento do código genético. Sua síntese primeiramente exigiu a síntese de moléculas de DNA para servir como moldes. H. Gobind Khorana sintetizou, por meio de métodos de química orgânica,

dois desoxirribonucleotídios complementares, cada um com nove resíduos: $d(TAC)_3$ e $d(GTA)_3$. Duplex parcialmente sobrepostos que se formaram na mistura destes oligonucleotídios serviram então como moldes para a síntese, pela DNA polimerase, de longas cadeias repetitivas de dupla hélice de DNA. O próximo passo era obter longas cadeias de polirribonucleotídios com a sequência complementar a apenas uma das duas fitas. Como o Khorana obteve apenas o poli(UAC)? E apenas o poli(GUA)?

38. *Triplo sentido.* O transcrito do RNA de uma região do DNA de um fago T4 contém a sequência 5′-AAAUGAGGA-3′. Esta sequência codifica três polipeptídios diferentes. O que são eles?

39. *Sinônimos valiosos.* As proteínas em geral têm baixo conteúdo de Met e Trp, conteúdos intermediários de His e Cis e alto conteúdo de Leu e Ser. Qual a relação entre o número de códons de aminoácidos e a frequência com a qual o aminoácido está presente nas proteínas? Qual pode ser a vantagem seletiva desta relação?

40. *Uma nova tradução.* Um RNA transportador com um anticódon UGU é enzimaticamente conjugado a uma cisteína marcada com ^{14}C. A unidade de cisteína é então quimicamente modificada a alanina (com o auxílio de níquel de Raney, que remove o átomo de enxofre da cisteína). O aminoacil-RNA alterado é adicionado a um sistema de síntese de proteína que contém componentes normais, à exceção deste tRNA. O mRNA adicionado à mistura contém a seguinte sequência:

5′-UUUUGCCAUGUUUGUGCU-3′

Qual a sequência do peptídio correspondente marcado radioativamente?

41. *Uma mudança complicada.* Defina a reorganização de éxon e explique porque sua ocorrência pode ser uma vantagem evolutiva.

42. *A unidade da vida.* Qual o significado do fato de que o mRNA humano pode ser corretamente traduzido na *E. coli*?

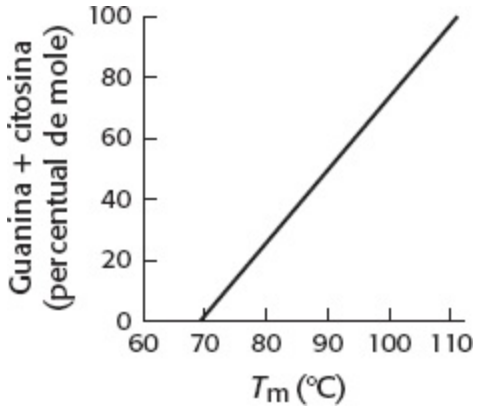
Questões | Integração de capítulos

43. *De volta à bancada.* Um químico de proteínas disse a um geneticista molecular que havia encontrado uma nova hemoglobina mutante na qual o aspartato substituiu a lisina. O geneticista se mostrou surpreso e mandou seu amigo rapidamente de volta ao laboratório. (a) Por que o geneticista duvidou da substituição de aminoácido informada? (b) Quais as substituições de aminoácidos poderiam ter sido mais possíveis ao geneticista?

44. *Éxons à parte.* As sequências de aminoácidos de uma proteína de levedura e uma proteína humana com a mesma função são 60% idênticas. No entanto, as sequências de DNA correspondentes são apenas 45% idênticas. Explique esta diferença.

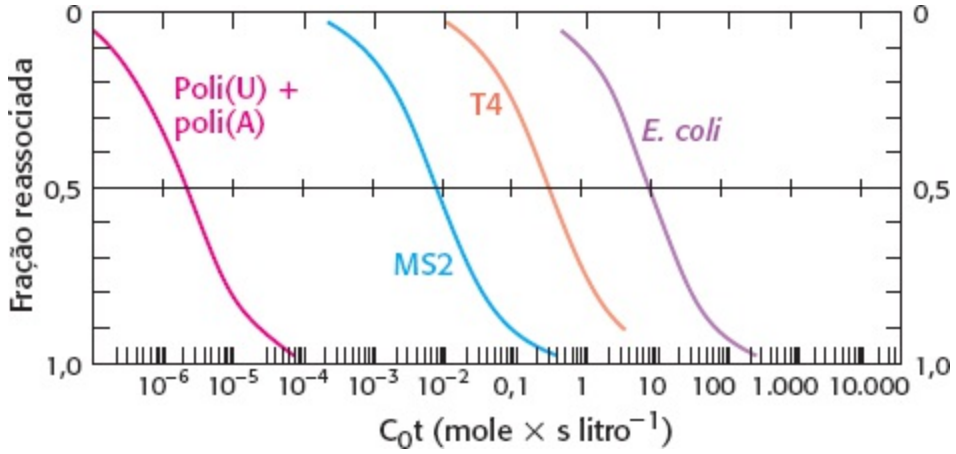
Questões | Interpretação de dados

45. *3 é maior que 2.* A ilustração abaixo ilustra a relação entre o percentual de pares de base GC no DNA e sua temperatura de desnaturação. Explique estes resultados.

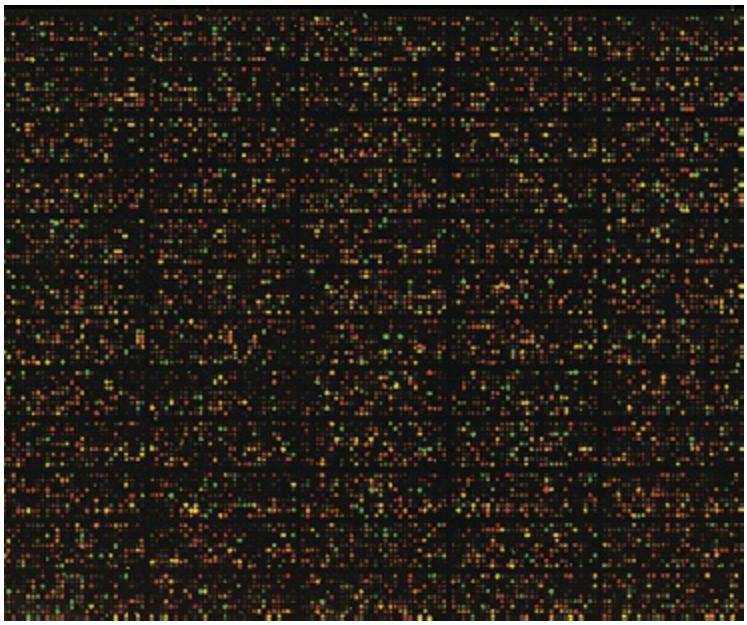


[Segundo R. J. Britten e D. E. Kohne, *Science* 161:529-540, 1968.]

46. *Explosão do passado.* A ilustração abaixo é um gráfico chamado de curva C_0t (pronuncia-se "cot"). O eixo y mostra o percentual de DNA que é de fita dupla. O eixo *x* é o produto da concentração de DNA e o tempo necessário para as moléculas de fita dupla se formarem. Explique por que a mistura de poli(A) e poli(U) e os três DNA mostrados variam no valor de C_0t necessário para seu anelamento completo. MS2 e T4 são vírus bacterianos (bacteriófagos) com genomas com tamanho de 3.569 e 168.903 pb, respectivamente. O genoma da *E. coli* tem $4{,}6 \times 10^6$ pb.



[Segundo J. Marmur e P. Doty, *J. Mol. Biol.* 5:120, 1962.]



Transformações como a de uma lagarta em borboleta ilustram as intensas alterações nos padrões da expressão gênica. Os níveis de expressão de milhares de genes podem ser monitorados por meio de sondas de DNA. À direita, uma microssonda de DNA revela os níveis de expressão de mais de 12.000 genes humanos; o brilho de cada ponto indica o nível de expressão do gene correspondente. [À esquerda, Cathy Keifer/istockphoto.com.; à direita, Agilent Technologies.]

SUMÁRIO

5.1 A exploração dos genes baseia-se em ferramentas específicas
5.2 A tecnologia do DNA recombinante revolucionou todos os aspectos da biologia
5.3 Genomas completos foram sequenciados e analisados
5.4 Genes eucarióticos podem ser quantificados e manipulados com considerável precisão

Desde seu aparecimento na década de 1970, a tecnologia de DNA recombinante revolucionou a bioquímica. O patrimônio genético dos organismos pode ser agora precisamente modificado de maneiras específicas. A tecnologia do DNA recombinante é fruto de diversas décadas de pesquisa básica sobre o DNA, RNA e vírus. Ela depende, primeiramente, da existência de enzimas que cortem, unam e repliquem o DNA e daquelas que possam transcrever reversamente o RNA. As enzimas de restrição cortam moléculas muito extensas de DNA em fragmentos específicos que podem ser manipulados; as DNA-ligases unem estes fragmentos. Muitos tipos de enzimas de restrição estão disponíveis. Por meio da aplicação deste sortimento de opções de maneira inteligente, os pesquisadores podem lidar com as sequências de DNA como módulos que podem ser movidos, conforme desejado, de uma molécula de DNA para outra. Assim, a tecnologia do DNA recombinante baseia-se no uso de enzimas cujos substratos são os ácidos nucleicos.

Um segundo fundamento é a linguagem de pareamento de bases que permite que sequências complementares reconheçam e se liguem umas as outras. A hibridização com sondas de DNA (cDNA) ou RNA é uma maneira sensível de detectar sequências específicas de nucleotídios. Na tecnologia do DNA recombinante, o pareamento de bases é usado para construir novas combinações de DNA, assim como para detectar e amplificar sequências em particular.

Além disso, métodos poderosos foram desenvolvidos para a determinação da sequência de nucleotídios no DNA. Estes métodos foram vinculados às sequências completas do genoma: primeiramente, pequenos genomas de vírus; depois, genomas maiores de bactérias; e, finalmente, genomas eucarióticos, incluindo o genoma humano de 3 bilhões de pares de bases. Os pesquisadores estão apenas começando a explorar o enorme conteúdo de informações contido nestas sequências genômicas.

Finalmente, a tecnologia do DNA recombinante depende criticamente de nossa capacidade de introduzir DNA exógeno em organismos hospedeiros. Por exemplo, fragmentos de DNA podem ser inseridos em plasmídios, onde podem ser replicados em um curto período de tempo em bactérias hospedeiras. Além disso, os vírus introduzem eficientemente seus próprios DNA (ou RNA) em hospedeiros, obrigando-os a replicar o genoma viral e a produzir proteínas virais ou a incorporar o DNA viral no genoma do próprio hospedeiro.

Estes novos métodos oferecem amplos benefícios a um grande número de disciplinas, incluindo biotecnologia, agricultura e medicina. Entre estes benefícios está a nossa maior compreensão sobre as patologias humanas. Ao longo deste capítulo, uma doença específica, a esclerose lateral amiotrófica (ELA ou ALS, do inglês, *amyotrophic lateral sclerosis*) será utilizada para ilustrar como a tecnologia do DNA recombinante influenciou o nosso conhecimento sobre os mecanismos desta patologia. A ELA foi inicialmente descrita clinicamente em 1869 pelo neurologista francês Jean-Martin Charcot como uma doença neurodegenerativa fatal, com enfraquecimento progressivo e atrofia da musculatura voluntária. A ELA é também conhecida como doença de Lou Gehrig, em decorrência do lendário jogador de beisebol, cujas carreira e vida foram prematuramente encurtadas em decorrência desta patologia devastadora. Por muitos anos pouco progresso foi feito no estudo dos

mecanismos subjacentes à ELA. Como veremos, avanços significativos foram feitos com o uso de ferramentas de pesquisa facilitadas pelo uso da tecnologia do DNA recombinante.

5.1 A exploração dos genes baseia-se em ferramentas específicas

O rápido progresso da biotecnologia – na verdade, a sua própria existência – é o resultado de algumas técnicas essenciais.

1. *Análise por enzimas de restrição.* As enzimas de restrição são bisturis moleculares precisos que permitem que o pesquisador manipule segmentos de DNA.

2. *Técnicas de blotting. Southern* e *Northern blotting* são utilizados para separar e caracterizar o DNA e o RNA, respectivamente. O *Western blot*, que utiliza anticorpos para caracterizar proteínas, foi descrito no Capítulo 3.

3. *Sequenciamento de DNA.* A sequência precisa de nucleotídios de uma molécula de DNA pode ser determinada. O sequenciamento forneceu ricas informações relativas à arquitetura do gene, e o controle da expressão gênica e da estrutura das proteínas.

4. *Síntese dos ácidos nucleicos em fase-sólida.* As sequências precisas dos ácidos nucleicos podem ser sintetizadas de novo e utilizadas para identificar ou amplificar outros ácidos nucleicos.

5. *Reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês polymerase chain reaction).* A reação em cadeia da polimerase fornece uma amplificação de um bilhão de vezes de um segmento de DNA. Uma molécula de DNA pode ser amplificada a quantidades que permitam sua caracterização e manipulação. Esta técnica poderosa pode ser usada para detectar patógenos e doenças genéticas, determinar a fonte do cabelo deixado na cena de um crime e ressuscitar genes de fósseis de organismos extintos.

Um conjunto final de técnicas conta com os computadores, sem os quais seria impossível catalogar, acessar e caracterizar a informação abundante gerada pelas técnicas supramencionadas. Tais usos dos computadores serão apresentados no Capítulo 6.

As enzimas de restrição cortam o DNA em fragmentos específicos

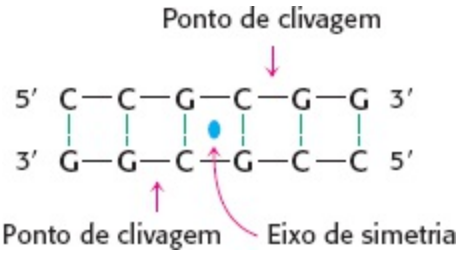
As enzimas de restrição, também conhecidas como *endonucleases de restrição,* reconhecem sequências de bases específicas na dupla hélice de DNA e cortam, em pontos específicos, ambas as fitas do DNA. Elas são indispensáveis para a análise da estrutura do cromossomo, para o sequenciamento de moléculas de DNA muito extensas, para o isolamento de genes e para a criação de novas moléculas de DNA para clonagem. Werner Arber e Hamilton Smith descobriram as enzimas de restrição, e Daniel Nathans foi o pioneiro no seu uso, no fim da década de 1960.

Palíndromo
Derivado do grego *palíndromos*, "que corre em sentido inverso, é uma palavra, frase ou verso que pode ser lido da mesma maneira tanto da direita para a esquerda quanto da esquerda para a direita.

Radar
Arroz é zorra

Roma me tem amor
Roma tibi subito motibus ibit amor ("Em Roma o amor lhe virá de repente")

As enzimas de restrição são encontradas em ampla variedade de procariotos. Sua função biológica é a de cortar moléculas de DNA exógenas. Muitas enzimas de restrição reconhecem sequências específicas de quatro a oito pares de bases e hidrolisam uma ligação fosfodiéster em cada fita de DNA nesta região. Uma característica marcante destes pontos de clivagem é que quase todos apresentam *simetria bilateral de rotação*. Em outras palavras, a sequência reconhecida é *palindrômica*, ou uma repetição invertida, e os pontos de clivagem são simetricamente posicionados. Por exemplo, a sequência reconhecida por uma enzima de restrição do *Streptomyces achromogenes* é



Em cada fita, a enzima corta a ligação fosfodiéster C–G do lado 3′ do eixo de simetria. Como veremos no Capítulo 9, esta simetria corresponde àquela das estruturas das próprias enzimas de restrição.

Várias centenas de enzimas de restrição foram purificadas e caracterizadas. Seus nomes consistem em uma abreviação de três letras para o organismo hospedeiro (p.ex., *Eco* para *Escherichia coli*, *Hin* para *Haemophilus influenzae*, *Hae* para *Haemophilus aegyptius*), seguida por uma designação de linhagem (se necessário) e um número romano (se mais de uma enzima de restrição da mesma linhagem tiver sido identificada). As especificidades de algumas destas enzimas estão mostradas na Figura 5.1.

As enzimas de restrição são usadas para cortar as moléculas de DNA em fragmentos específicos que são analisados e manipulados mais facilmente do que toda a molécula original. Por exemplo, o DNA circular em fita dupla de 5.1 kb do vírus oncogênico SV40 é clivado em um ponto pela *Eco*RI, em quatro pontos pela *Hpa*I e em 11 pontos pela *Hin*dIII. Um pedaço do DNA, chamado de fragmento de restrição, produzido pela ação de uma enzima de restrição, pode ser clivado especificamente em fragmentos menores por outra enzima de restrição. O padrão de tais fragmentos pode servir como a "*impressão digital*" de uma molécula de DNA, como será pormenorizado adiante. De fato, cromossomos complexos contendo centenas de milhões de pares de bases podem ser mapeados por meio do uso de uma série de enzimas de restrições.

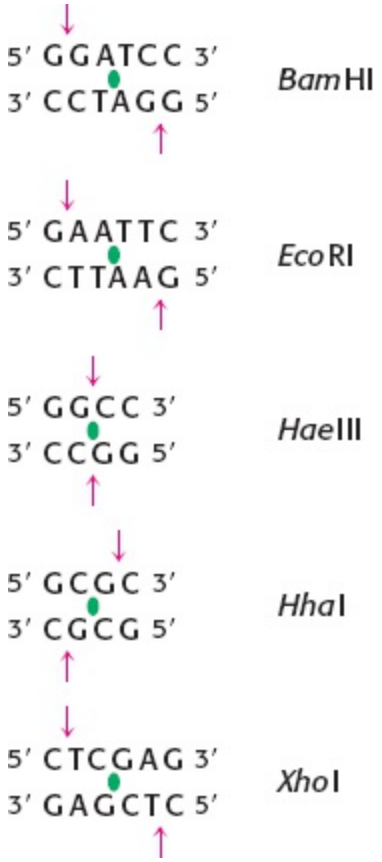


Figura 5.1 Especificidades de algumas endonucleases de restrição. As sequências que são reconhecidas por estas enzimas contêm simetria de eixo bilateral. As duas fitas nestas regiões são relacionadas por uma rotação de 180° em torno do eixo marcado pelo símbolo verde. Os pontos de clivagem são denotados por setas vermelhas. O nome abreviado de cada enzima de restrição é dado à direita da sequência que ela reconhece. Observe que os cortes podem ser nos mesmos locais ou desencontrados.

Os fragmentos de restrição podem ser separados e visualizados por gel de eletroforese

Pequenas diferenças entre as moléculas de DNA relacionadas podem ser detectadas porque seus fragmentos de restrição podem ser separados e exibidos por gel de eletroforese. No Capítulo 3 consideramos o uso da eletroforese em gel para separar moléculas de proteínas (Seção 3.1). Uma vez que o arcabouço fosfodiéster do DNA é consideravelmente carregado negativamente, esta técnica também é adequada para a separação dos fragmentos dos ácidos nucleicos. Para a maioria dos géis, quanto menor o fragmento de DNA, mais distante a migração. Géis de poliacrilamida são usados para separar, por tamanhos, os fragmentos que contêm até 1.000 pares de bases, enquanto géis de agarose, mais porosos, são usados para misturas de fragmentos maiores (tão grandes quanto 20 kb). Uma característica importante destes géis é seu alto poder de resolução: em certos tipos de géis, diferenças de comprimento de apenas um nucleotídio em fragmentos de centenas de nucleotídios podem ser distinguidos. Bandas ou pontos de DNA radioativo em géis podem ser visualizadas por autorradiografia. Alternativamente, um gel pode ser corado com brometo de etídio, que floresce um tom laranja intenso quando ligado à molécula de DNA em dupla hélice (Figura 5.2). Uma banda contendo apenas 50 ng de DNA pode ser prontamente vista.

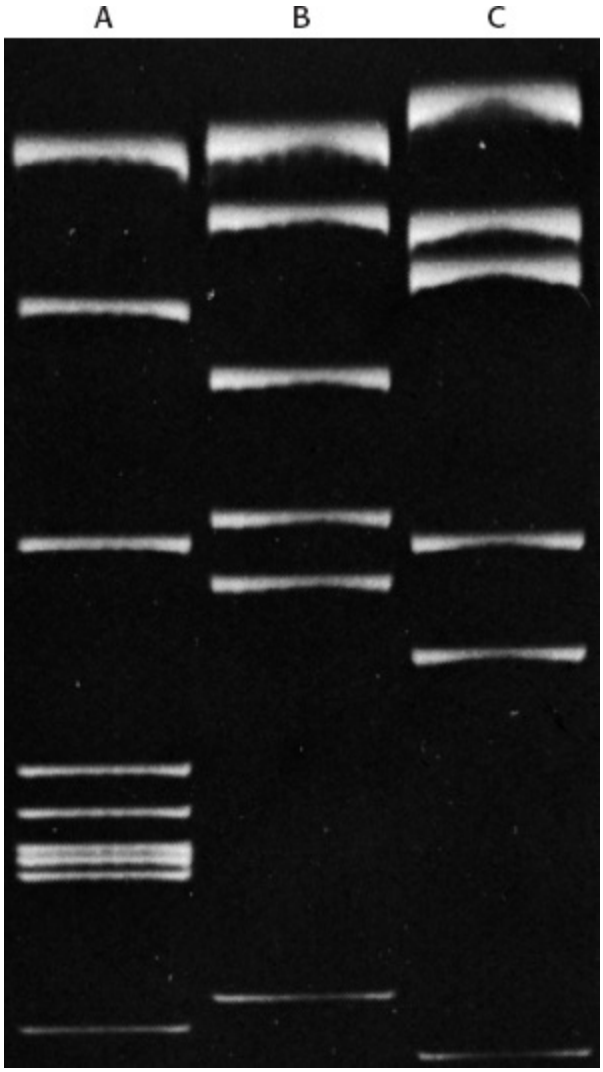


Figura 5.2 Padrão de um gel de eletroforese de uma digestão de restrição. Este gel mostra os fragmentos produzidos com a clivagem do DNA do SV40 com três diferentes enzimas de restrição. Estes fragmentos se tornaram fluorescentes por meio da coloração do gel com brometo de etídio. [Cortesia do Dr. Jeffrey Sklar.]

Um fragmento de restrição contendo uma sequência específica de bases pode ser identificado por meio de sua hibridização com um DNA complementar marcado (Figura 5.3). Uma mistura de fragmentos de restrição é separada por eletroforese através de um gel de agarose, desnaturada para formar DNA de fita única e transferida para um papel de nitrocelulose. As posições dos fragmentos de DNA no gel são preservadas na folha de nitrocelulose, onde eles serão expostos a uma *sonda* de DNA de fita única marcada com ^{32}P. A sonda se hibridiza com o fragmento de restrição que tem uma sequência complementar à sua, e a autorradiografia então revela a posição do dúplex fragmento de restrição-sonda. Um fragmento específico em meio a milhões de outros pode ser prontamente identificado desta maneira. Esta poderosa técnica é chamada de *Southern blotting*, em homenagem ao seu inventor, Edwin Southern.

De maneira similar, moléculas de RNA podem ser separadas por eletroforese em gel e suas sequências específicas podem ser identificadas por hibridização subsequente a sua transferência para a nitrocelulose. Esta técnica análoga para a análise do RNA foi excentricamente chamada de *Northern blotting*. Outro jogo de palavras é o termo *Western blotting*, que se refere à técnica para a detecção de uma proteína específica por meio de sua ligação-marcação com um anticorpo específico (Seção 3.3). *Southern, Northern e Western blot*s também são conhecidos, respectivamente, por *transferência* de *DNA*, *RNA* e *proteína*.

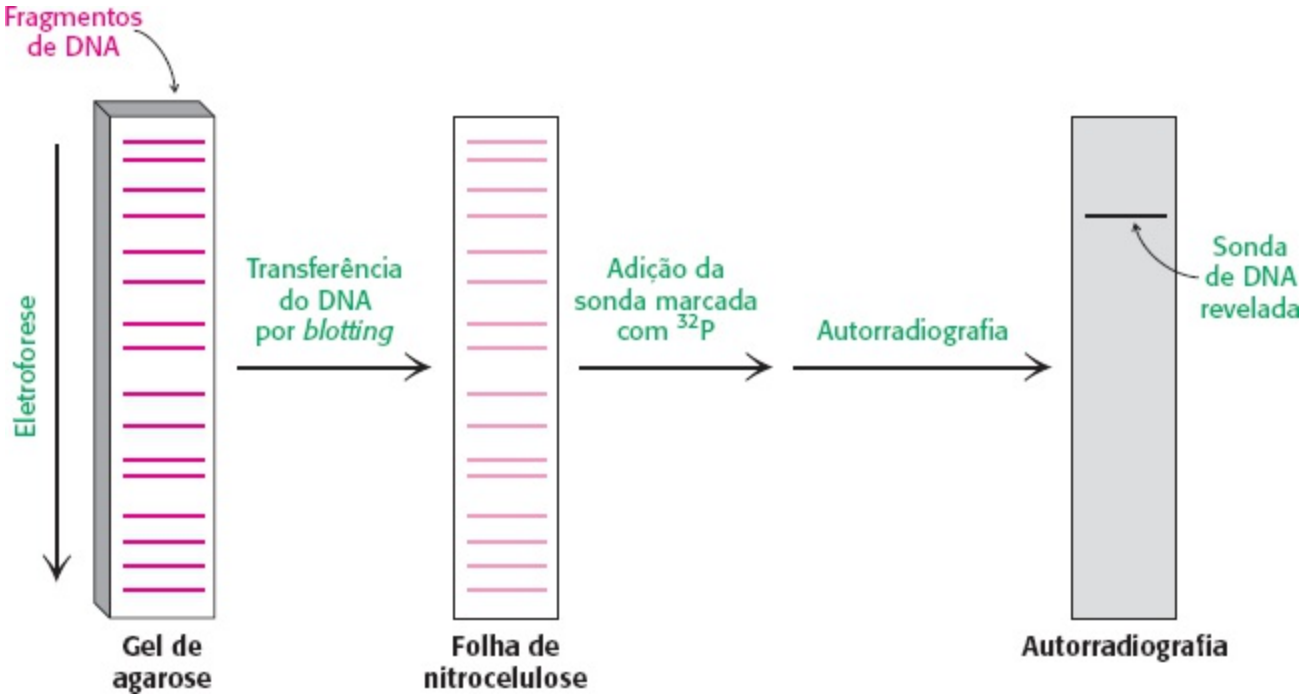


Figura 5.3 *Southern blotting*. Um fragmento de DNA contendo uma sequência específica pode ser identificado por meio da separação de uma mistura de fragmentos por eletroforese, transferindo-os para a nitrocelulose e hibridizando-os com uma sonda complementar à sequência marcada com ^{32}P. O fragmento contendo a sequência é então visualizado por autorradiografia.

O DNA pode ser sequenciado pelo controle do término da replicação

A análise da estrutura do DNA e seu papel na expressão do gene foi muito facilitada pelo desenvolvimento de poderosas técnicas de *sequenciamento* das moléculas de DNA. O elemento essencial para o sequenciamento do DNA é a geração de fragmentos de DNA cujo comprimento dependa da última base da sequência. Coleções de tais fragmentos podem ser geradas por meio do controle do *término da replicação* (método didesoxi de Sanger), um método desenvolvido por Frederick Sanger e colaboradores. Esta técnica substituiu métodos alternativos por conta de sua simplicidade. O mesmo procedimento é executado em quatro reações individuais ao mesmo tempo. Em todas estas reações uma DNA polimerase é utilizada para fazer a sequência complementar de uma molécula de DNA de fita única específica. O processo é iniciado por um fragmento quimicamente sintetizado, complementar a uma parte da sequência conhecida em outros estudos. Adicionalmente aos quatro trifosfatos de desoxirribonucleosídios (marcados radioativamente), cada reação contém uma pequena quantidade dos *análogos 2'-3' didesoxi* de um dos nucleotídios, um nucleotídio diferente para cada reação.

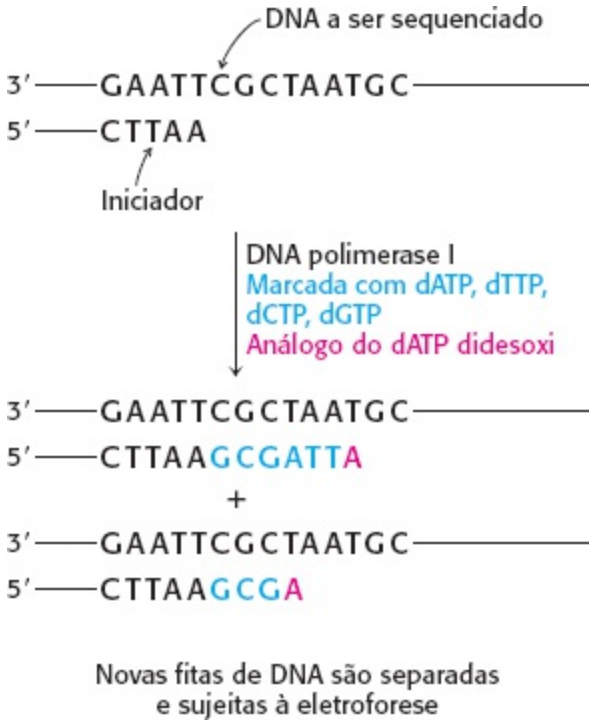
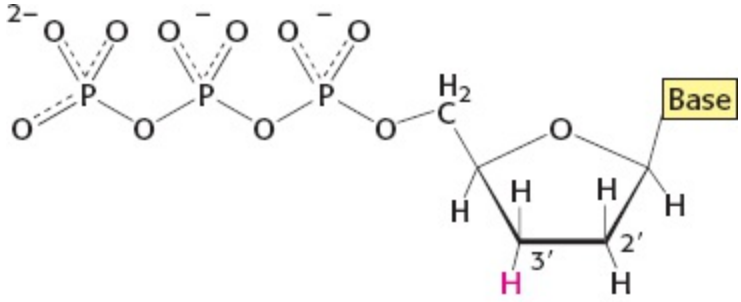


Figura 5.4 Estratégia do método de terminação de cadeia para o sequenciamento do DNA. Os fragmentos são produzidos por meio da adição do análogo 2′-3′ didesoxi de um dNTP a cada uma das misturas de polimerização. Por exemplo, a adição do análogo didesoxi do dATP (mostrado em vermelho) fornece fragmentos terminados em A. A fita não pode ser estendida após o análogo didesoxi.



A incorporação destes análogos bloqueia o crescimento adicional da cadeia nova porque eles não têm uma hidroxila terminal 3′ necessária para a formação da próxima ponte fosfodiéster. A concentração do análogo didesoxi é baixa o suficiente para que o término da cadeia ocorra apenas ocasionalmente. A polimerase inserirá o nucleotídio correto algumas vezes e o análogo didesoxi outras vezes, interrompendo a reação. Por exemplo, se o análogo didesoxi do dATP estiver presente, fragmentos de variados tamanhos serão produzidos, mas todos serão terminados pelo análogo didesoxi (Figura 5.4). É importante salientar que este análogo didesoxi do dATP será inserido apenas onde um T estava localizado no DNA que está sendo sequenciado. Assim, os fragmentos de diferentes tamanhos corresponderão às posições do T. Quatro destes conjuntos de *fragmentos de cadeia terminados* (um para cada análogo didesoxi) serão submetidos à eletroforese, e a sequência de bases do novo DNA será lida por autorradiografia das quatro colunas.

A detecção por fluorescência é uma alternativa altamente eficiente à autorradiografia porque elimina o uso de reagentes radioativos e pode ser prontamente automatizada. Uma etiqueta fluorescente é incorporada a cada análogo didesoxi – uma marca de cor diferente para cada um dos quatro terminadores de cadeia (p.ex., um emissor azul para a terminação em A e um vermelho para a

terminação em C). Com o uso de uma mistura de terminadores, uma única reação pode ser executada, e os fragmentos resultantes são separados pela técnica conhecida como *eletroforese capilar*, na qual uma mistura é passada por um tubo extremamente fino, sob alta voltagem, para se obter uma separação eficiente dentro de pouco tempo. À medida que os fragmentos de DNA emergem do capilar, eles são detectados por sua fluorescência; a sequência de suas cores fornece diretamente a sequência de bases (Figura 5.5). Sequências de até 500 bases podem ser determinadas desta maneira. De fato, os instrumentos modernos de sequenciamento de DNA podem sequenciar mais de um milhão de bases por dia por este método.

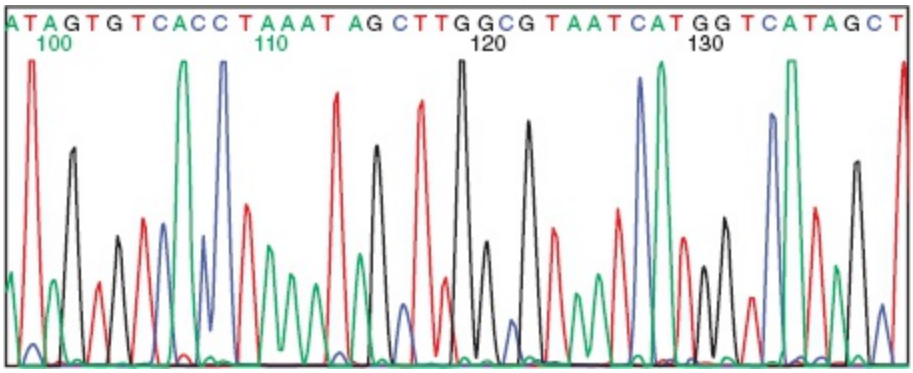
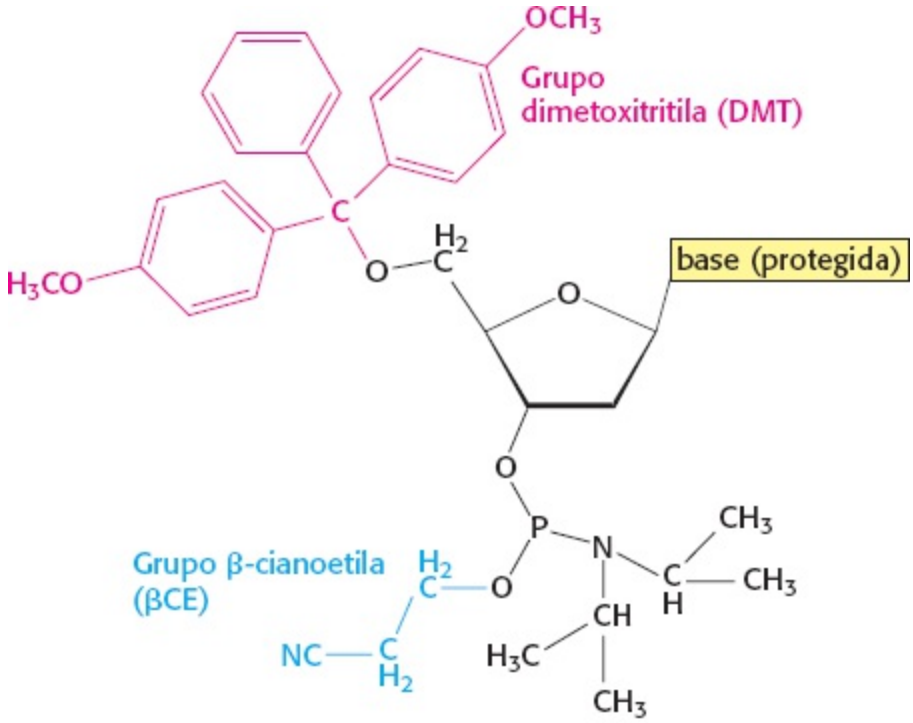


Figura 5.5 Detecção de fluorescência de fragmentos de oligonucleotídios produzidos pelo método didesoxi. Uma reação de sequenciamento é executada com quatro nucleotídios didesoxi terminadores de cadeia, cada um marcado com uma etiqueta que fluoresce a em um comprimento de onda diferente (p.ex., vermelho para T). Cada uma das quatro cores representa uma base diferente em um traço cromatográfico produzido pelas medidas de fluorescência em quatro comprimentos de ondas. [Segundo A. J. F. Griffiths *et. al.*, *An Introduction to Genetic Analysis,* 8th ed. (W.H. Freeman and Company, 2005).]

Sondas de DNA e genes podem ser sintetizados em fase sólida por métodos automatizados

Fitas de DNA, bem como polipeptídios (Seção 3.4), podem ser sintetizadas por meio da adição sequencial de monômeros ativados a uma cadeia em crescimento ligada a um suporte insolúvel. Os monômeros ativados são *desoxirribonucleosídios 3′-fosforamidita*. Na primeira etapa, o átomo 3′ de fósforo da unidade a ser acrescentada se une ao átomo de oxigênio 5′ da cadeia em crescimento, para formar um *fosfito triéster* (Figura 5.6). O grupo 5 -OH do monômero ativado não é reativo porque é bloqueado pelo grupo protetor dimetoxitritil (DMT), e o grupo 3′-fosforila torna-se não reativo pela ligação do grupo β-cianoetil (βCE). Da mesma maneira, os grupos amino das bases purínicas e pirimidínicas são bloqueados.



Desoxirribonucleosídio 3′-fosforamidita com DMT e βCE ligados

O acoplamento é executado sob condições anidras, porque a água reage com os fosforamiditos. Na segunda etapa, o fosfito triéster (no qual o P é trivalente) é oxidado pelo iodo e forma um *fosfotriéster* (no qual o P é pentavalente). Na terceira etapa, o grupo DMT protetor do grupo 5 -OH da cadeia em crescimento é removido pela adição de ácido dicloroacético, que deixa os outros grupos protetores intactos. A cadeia de DNA é agora alongada em uma unidade e pronta para outro ciclo de adição. Cada ciclo demora apenas cerca de 10 min e normalmente alonga mais de 99% das cadeias.

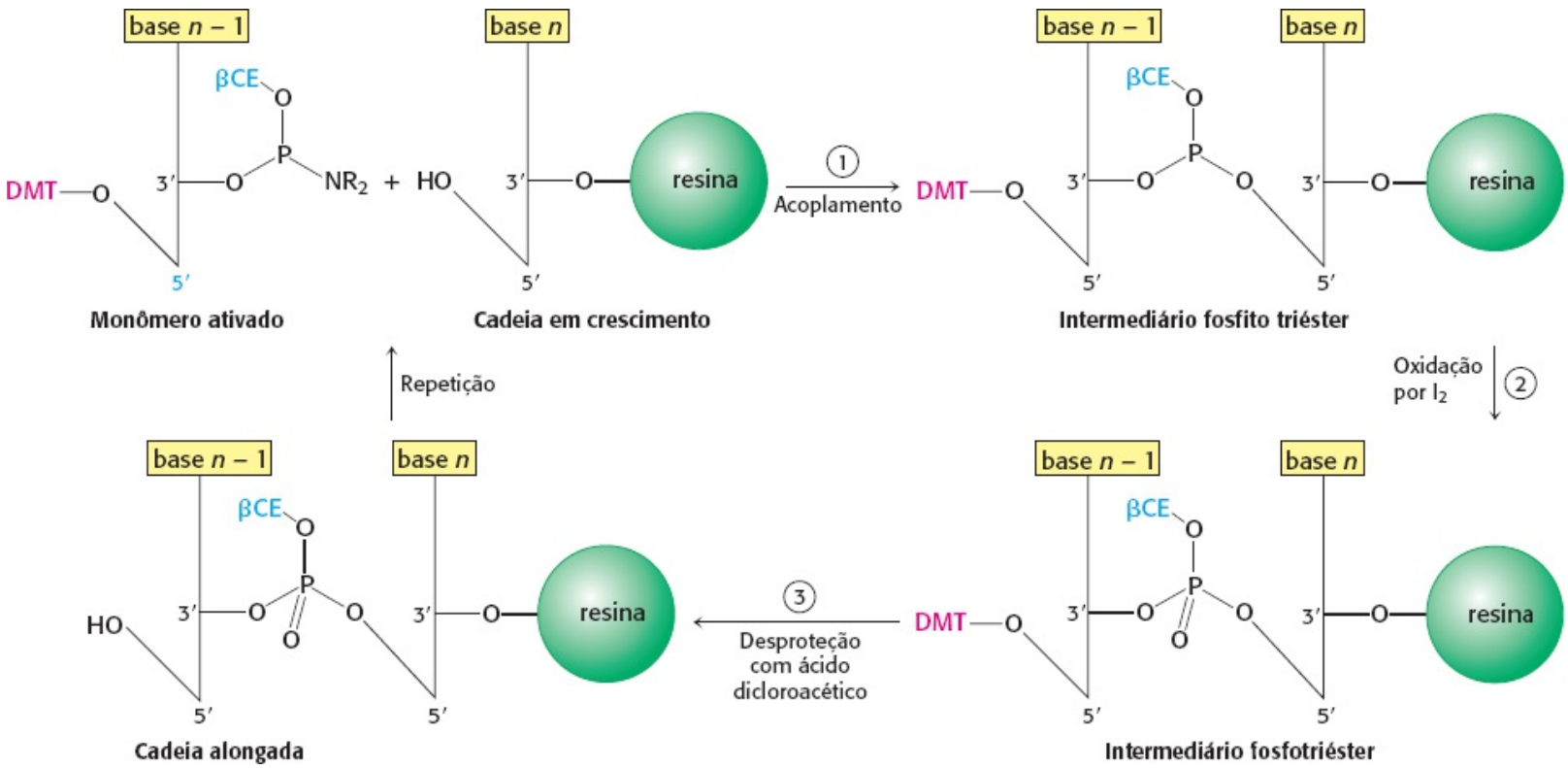


Figura 5.6 Síntese em fase sólida de uma cadeia de DNA pelo método fosfito triéster. O monômero ativado adicionado à nova cadeia em crescimento é um desoxirribonucleosídio 3-fosforamidita contendo um grupo protetor

dimetoxitritila (DMT) em seu átomo de oxigênio 5′, um grupo β-cianoetil (βCE) protetor em seu átomo de oxigênio 3′ fosforila e um grupo protetor na base.

Esta abordagem de fase sólida é ideal para a síntese de DNA, assim como para polipeptídios, porque o produto desejado permanece no suporte insolúvel até a etapa final de liberação. Todas as reações ocorrem em um único recipiente, e o excesso de reagentes solúveis pode ser adicionado para conduzir as reações ao seu término. Ao fim de cada etapa, os reagentes solúveis e seus subprodutos são lavados da resina que porta as cadeias em crescimento. Ao fim da síntese, NH_3 é adicionado para remover todos os grupos protetores e liberar o oligonucleotídio de seu suporte sólido. Como o alongamento nunca é 100% completo, as novas cadeias de DNA têm tamanhos diferentes – a cadeia desejada é a maior de todas. A amostra pode ser purificada por cromatografia líquida de alta pressão ou por eletroforese em gel de poliacrilamida. Cadeias de DNA com até 100 nucleotídios podem ser prontamente sintetizadas por este método automatizado.

A capacidade de sintetizar rapidamente cadeias de DNA de qualquer sequência desejada abre muitas possibilidades experimentais. Por exemplo, um oligonucleotídio sintetizado marcado em uma extremidade com um ^{32}P ou com uma etiqueta fluorescente pode ser utilizado para investigar uma sequência complementar em uma molécula muito extensa de DNA ou mesmo em um genoma com muitos cromossomos. O uso de oligonucleotídios marcados como sondas de DNA é uma técnica poderosa e ampla. Por exemplo, uma sonda de DNA que possa parear com uma sequência complementar conhecida em um cromossomo pode servir como ponto de partida para a exploração do DNA inexplorado adjacente. Tal sonda pode ser usada como iniciador para começar a replicação do DNA vizinho pela DNA polimerase. Uma aplicação interessantíssima da abordagem de fase sólida é a síntese de genes feitos sob medida. Novas proteínas, com novas propriedades, podem ser agora produzidas em abundância pela expressão de genes sintéticos. Finalmente, o esquema de síntese descrito até o momento pode ser ligeiramente modificado para a síntese em fase sólida de oligonucleotídios de RNA, que podem ser reagentes poderosos para a degradação de moléculas específicas de mRNA em células vivas por meio da técnica conhecida como interferência de RNA (Seção 5.4).

As sequências de DNA selecionadas podem ser imensamente amplificadas pela reação em cadeia da polimerase

Em 1984, Kary Mullis desenvolveu um método engenhoso chamado de *reação em cadeia da polimerase* (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) para amplificar sequências de DNA específicas. Considere um DNA de fita dupla que consiste em uma sequência-alvo cercada de um trecho de DNA qualquer. Milhões de cópias das sequências-alvo podem ser prontamente obtidas por meio da PCR se as sequências flanqueadoras do alvo forem conhecidas. A PCR é realizada por meio da adição dos seguintes componentes à solução contendo a sequência-alvo: (1) um par de iniciadores que se hibridizem com as sequências flanqueadoras do alvo, (2) os quatro trifosfatos de nucleosídios (dNTP), e (3) uma DNA polimerase termoestável. Um ciclo de PCR consiste em três etapas (Figura 5.7).

1. Separação das fitas. As duas fitas da molécula de DNA original são separadas por meio do aquecimento da solução a 95°C por 15 s.

2. Hibridização dos iniciadores. A solução é abruptamente resfriada a 54°C, para permitir que cada iniciador se hibridize com uma fita de DNA. Um inciador se hibridiza com a extremidade 3′ do alvo em uma fita e o outro iniciador se hibridiza com a extremidade 3′ da fita-alvo complementar. Os DNA em fita dupla originais não se formam porque os iniciadores estão presentes em grande excesso. Os iniciadores tipicamente têm de 20 a 30 nucleotídios de extensão.

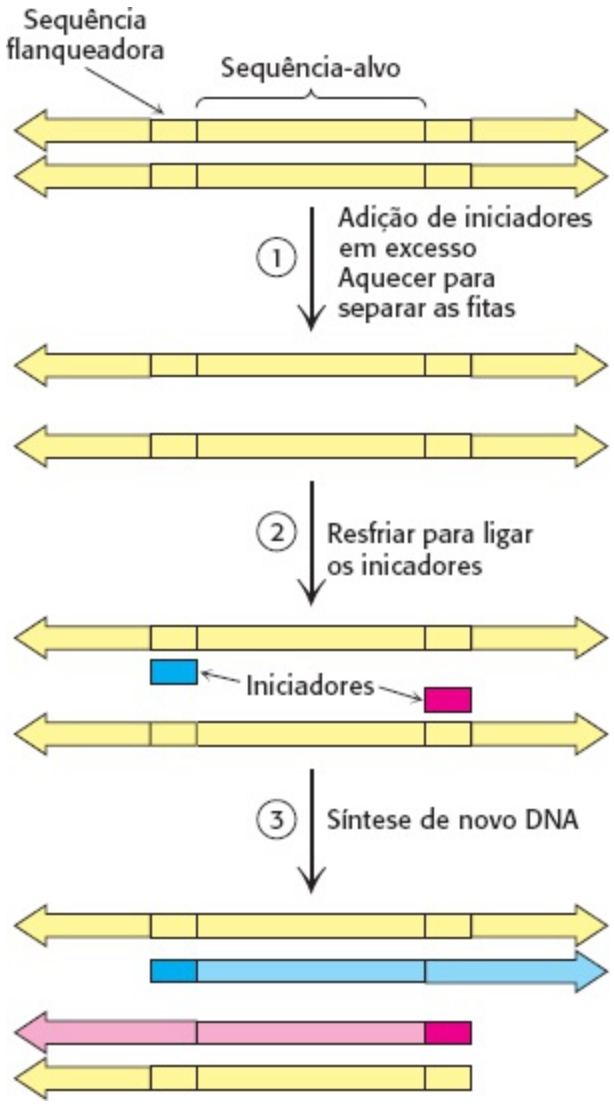


Figura 5.7 O primeiro ciclo da reação em cadeia da polimerase (PCR). Um ciclo consiste em três etapas: separação das fitas, a hibridização dos iniciadores e a extensão dos iniciadores pela síntese de DNA.

3. Síntese de DNA. A solução é então aquecida a 72°C, a temperatura ótima para as polimerases termoestáveis. Uma destas enzimas é a *Taq* DNA polimerase, que é proveniente da *Thermus aquaticus*, uma bactéria termofílica que vive em fontes térmicas. A polimerase alonga ambos os iniciadores na direção da sequência-alvo porque a síntese do DNA ocorre na direção 5′-3′. A síntese de DNA ocorre em ambas as fitas, mas vai além da sequência-alvo.

Estas três etapas – separação das fitas, hibridização dos iniciadores e síntese de DNA – constituem um ciclo de amplificação da PCR e podem ser executadas repetidamente, apenas mudando a temperatura da mistura de reação. A termoestabilidade da polimerase torna possível executar a PCR em um recipiente fechado; nenhum reagente é adicionado após o primeiro ciclo. Ao fim do segundo ciclo, quatro dúplex contendo a sequência-alvo foram formados (Figura 5.8). Das oito fitas de DNA que constituem estes dúplex, duas fitas curtas constituem apenas a sequência-alvo –

sequência que inclui e é margeada pelos iniciadores. Os ciclos subsequentes irão amplificar a sequência-alvo exponencialmente. De maneira ideal, após *n* ciclos, a sequência desejada é amplificada 2_n vezes. A amplificação é de um milhão de vezes após 20 ciclos e de um bilhão de vezes após 30 ciclos, o que pode ser executado em menos de uma hora.

Diversas características deste método para a amplificação de DNA são notáveis. Em primeiro lugar, a sequência-alvo não precisa ser conhecida. É exigido apenas o conhecimento das sequências flanqueadoras, de modo que os iniciadores complementares possam ser sintetizados. Em segundo lugar, o alvo pode ser muito maior que os iniciadores. Alvos maiores que 10 kb foram amplificados por PCR. Em terceiro lugar, os iniciadores não têm que ser perfeitamente pareados com as sequências flanqueadoras para amplificar os alvos. Com o uso de iniciadores derivados de um gene de sequência conhecida, é possível procurar por variações do mesmo tema. Desta maneira, famílias de genes estão sendo descobertas por PCR. Em quarto lugar, a PCR é altamente específico pelo rigor da hibridização em temperaturas relativamente altas. O *rigor* é a semelhança necessária entre o iniciador e o alvo, que pode ser controlada pela temperatura e sal. Em altas temperaturas, apenas o DNA entre os iniciadores hibridizados é amplificado. Um gene que constitui menos do que um milionésimo do DNA total de um organismo superior é acessível à PCR. Em quinto lugar, a PCR é extremamente sensível. Uma única molécula de DNA pode ser amplificada e detectada.

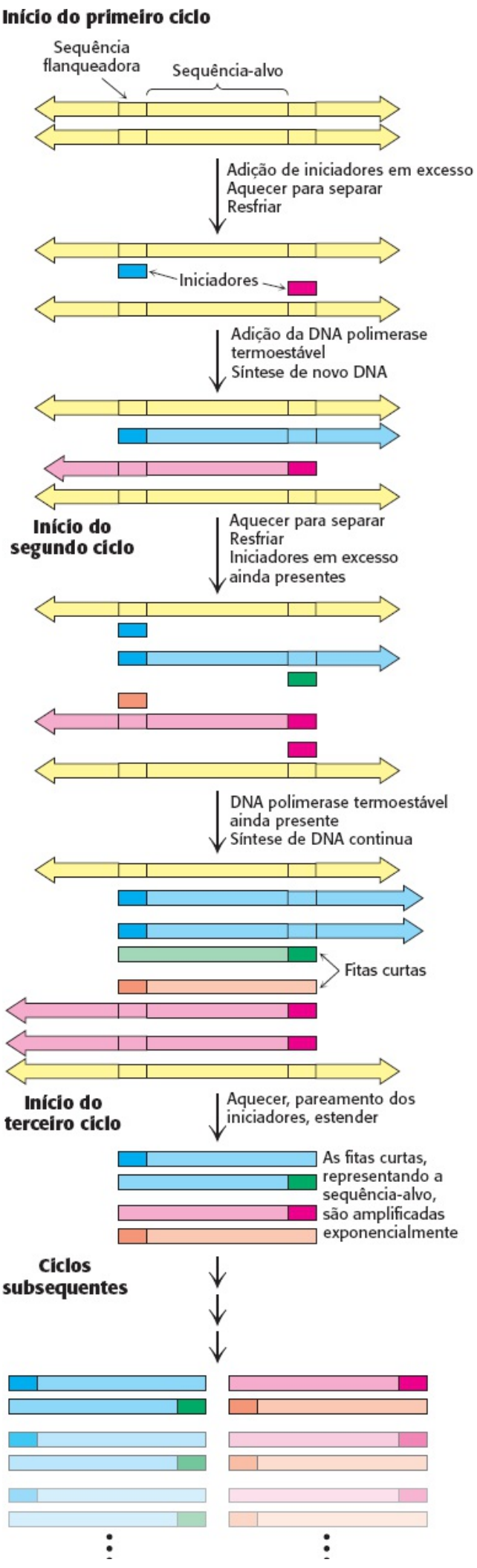

Início do primeiro ciclo
Sequência flanqueadora
Sequência-alvo
Adição de iniciadores em excesso
Aquecer para separar
Resfriar
Iniciadores
Adição da DNA polimerase termoestável
Síntese de novo DNA
Início do segundo ciclo
Aquecer para separar
Resfriar
Iniciadores em excesso ainda presentes
DNA polimerase termoestável ainda presente
Síntese de DNA continua
Fitas curtas
Início do terceiro ciclo
Aquecer, pareamento dos iniciadores, estender
As fitas curtas, representando a sequência-alvo, são amplificadas exponencialmente
Ciclos subsequentes

Figura 5.8 Múltiplos ciclos da reação em cadeia da polimerase. As duas fitas pequenas produzidas ao fim do terceiro ciclo (em conjunto com as fitas mais longas, não mostradas) representam a sequência-alvo. Os ciclos subsequentes irão amplificar a sequência-alvo exponencialmente e a sequência original aritmeticamente.

A PCR é uma poderosa ferramenta para diagnósticos médicos, medicina forense e estudos sobre evolução molecular

A PCR pode fornecer informações diagnósticas valiosas na medicina. Bactérias e vírus podem ser prontamente detectados com o uso de iniciadores específicos. Por exemplo, a PCR pode revelar a presença de pequenas quantidades de DNA do vírus da imunodeficiência humana (HIV) em pessoas que ainda não têm uma resposta imune estabelecida a este patógeno. Nestes pacientes, ensaios desenvolvidos para detectar anticorpos contra o vírus gerariam resultados falso-negativos. Encontrar o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* em espécimes de tecidos é lento e trabalhoso. Com a PCR, tão poucos quanto 10 bacilos da tuberculose por milhão de células humanas podem ser prontamente detectados. A PCR é um método promissor para a detecção inicial de certos tipos de câncer. Esta técnica pode identificar mutações de certos genes que controlam o crescimento, como os genes *ras* (Capítulo 14). A grande capacidade de amplificação de regiões selecionadas do DNA pode também ser altamente informativa no monitoramento da quimioterapia anticâncer. Testes usando PCR podem detectar quando as células cancerosas foram eliminadas e quando o tratamento pode ser interrompido; ele pode também detectar uma recidiva e a necessidade imediata de retorno ao tratamento. A PCR é ideal para detectar leucemias causadas por rearranjos cromossômicos.

A PCR também está fazendo a diferença na medicina legal e forense. Um DNA individual é altamente distintivo porque muitos *loci* genéticos são altamente variáveis dentro de uma população. Por exemplo, variações em uma localização específica determinam o tipo de HLA de uma pessoa (tipo de antígeno leucocitário humano, Seção 34.5); transplantes de órgãos são rejeitados quando os tipos de HLA do doador e do receptor não são semelhantes o suficiente. A amplificação por PCR de múltiplos genes está sendo usada para estabelecer o parentesco biológico em situações de paternidade questionada ou imigrações. Análises de manchas de sangue e amostras de sêmen por meio da PCR têm implicado culpa ou inocência a numerosos casos de violência e estupros. A raiz de um único fio de cabelo encontrado em uma cena de um crime contém DNA suficiente para ser tipificado por PCR (Figura 5.9).

O DNA é uma molécula notavelmente estável, particularmente quando protegida do ar, luz e água. Sob tais condições, grandes fragmentos de DNA podem ficar intactos por milhares de anos – ou mais. A PCR fornece um método ideal para amplificar estas moléculas de DNA antigas, de modo que eles possam ser detectados e caracterizados (Seção 6.5). A PCR pode também ser utilizado para amplificar o DNA de microrganismos que ainda não foram isolados e cultivados. Como será discutido no Capítulo 6, sequências destes produtos de PCR podem suscitar muitas ideias sobre as relações evolutivas entre organismos.

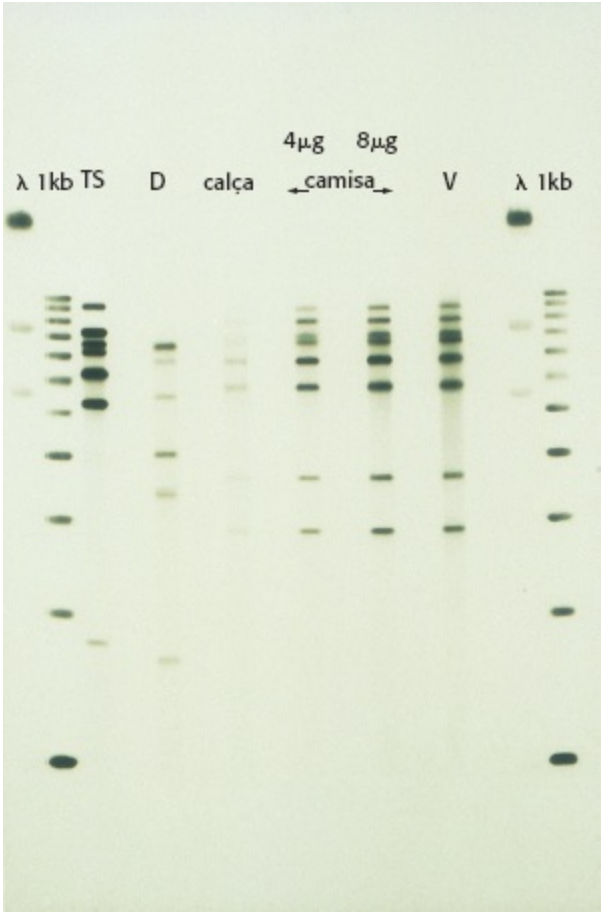


Figura 5.9 DNA e medicina forense. O DNA isolado de manchas de sangue na calça e na camisa de um réu foi amplificado por PCR e então comparado com o DNA da vítima, assim como o do réu, usando eletroforese em gel e autorradiografia. O DNA das manchas de sangue na roupa do réu correspondeu ao DNA da vítima, mas não com seu próprio. A frequência de coincidências na correspondência de DNA na roupa e na vítima é de aproximadamente 1 em 33 bilhões. As colunas λ, 1kb e TS referem-se às amostras-controle; a coluna D, ao DNA do réu; calça e camisa, DNA isolado das manchas de sangue da vestimenta do réu (duas quantidades diferentes analisadas); V, amostra de DNA do sangue da vítima. [Cortesia do Cellmark Diagnostic, Germantown, Maryland.]

As ferramentas da tecnologia do DNA recombinante foram utilizadas para identificar mutações causadores de patologias

Consideremos agora como as técnicas recém-descritas têm sido utilizadas em conjunto para estudar a ELA (esclerose lateral amiotrófica), introduzida no início do capítulo. Cinco por cento de todos os pacientes acometidos por ELA têm familiares que também foram diagnosticados com a doença. Um padrão de herdabilidade em uma doença é um indicativo de um forte componente de causa genética de uma patologia. Para identificar estas alterações genéticas patogênicas, os pesquisadores identificaram *polimorfismos* (regiões de variação genética), dentro de uma família afetada, que se correlaciona com o aparecimento da doença. Os polimorfismos podem, eles mesmos, causar as doenças, ou podem estar intimamente associados a outras alterações genéticas que o fazem. Uma classe de polimorfismos são os *polimorfismos dos comprimentos de fragmento de restrição* (RFLP, do inglês *restriction-fragment-length polymorphisms*), que são mutações nos sítios de restrição que alteram os tamanhos dos fragmentos de DNA produzidos por enzimas de restrição apropriadas. Usando enzimas de restrição e *Southern blot*s, os pesquisadores identificaram RFLP que são encontrados preferencialmente em membros de famílias com diagnóstico positivo para ELA. Para algumas destas famílias, foram obtidas fortes evidências para a localização da mutação patogênica

em uma região específica do cromossomo 21.

Após a identificação da provável localização de um destes genes patogênicos, o mesmo grupo de pesquisa comparou os locais dos RFLP associados à ELA com a sequência conhecida do cromossomo 21. Eles perceberam que este *locus* cromossômico contém o gene *SOD1*, que codifica a proteína superóxido dismutase Cu/Zn SOD1, uma enzima importante para a proteção das células contra os danos oxidativos (Seção 18.3). A amplificação por PCR de regiões do gene *SOD1* do DNA dos membros da família afetados, seguida do método didesoxi Sanger de sequenciamento do fragmento-alvo, permitiu a identificação de 11 mutações patogênicas, em 13 famílias diferentes. Esse trabalho foi fundamental para dar foco às questões subsequentes sobre os papéis da superóxido dismutase e suas formas mutantes correspondentes na patogenia da ELA.

5.2 A tecnologia do DNA recombinante revolucionou todos os aspectos da biologia

O trabalho pioneiro de Paul Berg, Herbert Boyer e Stanley Cohen no início da década de 1970 promoveu o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, o que elevou a biologia, até então uma ciência exclusivamente analítica, a uma ciência sintética. Novas combinações de genes não relacionados podem ser construídas no laboratórios por meio da aplicação das técnicas de DNA recombinante. Estas novas combinações podem ser clonadas – amplificadas muitas vezes – por meio de sua introdução em células adequadas, onde elas podem ser replicadas pelo maquinário de síntese de DNA do hospedeiro. Os genes inseridos são geralmente transcritos e traduzidos em seu novo contexto. O mais incrível é que o arcabouço genético do hospedeiro pode ser permanentemente alterado de uma maneira programada.

As enzimas de restrição e a DNA ligase são ferramentas fundamentais para formar as moléculas de DNA recombinante

Comecemos a ver como novas moléculas de DNA podem ser construídas em um laboratório. Uma ferramenta essencial para a manipulação de DNA recombinante é um *vetor*, uma molécula de DNA que possa replicar de maneira autônoma em um organismo hospedeiro apropriado. Os vetores são projetados para permitirem a inserção rápida e covalente de fragmentos de DNA de interesse. *Plasmídios* (círculos de DNA de ocorrência natural que agem como cromossomos acessórios em bactérias) e o bacteriófago λ (fago λ), um vírus, são vetores de escolha para clonagem em *E. coli*. O vetor pode ser preparado para aceitar o novo fragmento de DNA por meio de sua clivagem em um local específico com uma enzima de restrição. Por exemplo, o plasmídio pSC101, uma molécula circular de DNA em dupla hélice de 9,9 kb, é cisado em um único ponto pela enzima de restrição *Eco*RI. Os cortes feitos por esta enzima produzem *extremidades complementares de fita única*, que têm afinidade específica uma pela outra e, assim, são conhecidas como *extremidades coesivas* ou *adesivas*. Qualquer fragmento de DNA pode ser inserido neste plasmídio se tiver as mesmas extremidades adesivas. Tal fragmento pode ser preparado a partir de um DNA maior, utilizando-se a mesma enzima de restrição que foi usada para abrir o DNA do plasmídio (Figura 5.10).

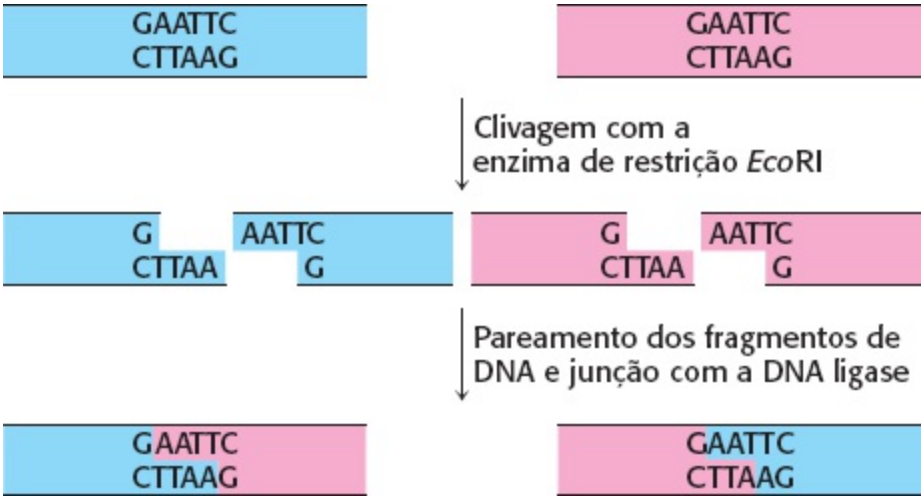


Figura 5.10 União de moléculas de DNA pelo método de extremidades coesivas. Duas moléculas de DNA, clivadas com uma enzima de restrição comum como a *Eco*RI, podem ser ligadas para formar uma molécula recombinante.

As extremidades em fita única do fragmento são então complementares àquelas do plasmídio cortado. O fragmento de DNA e o plasmídio cortado podem ser anelados e unidos pela DNA *ligase*, que catalisa a formação de uma ponte fosfodiéster em uma quebra da cadeia de DNA. A DNA ligase precisa de um grupo 3′-hidroxila livre e de um grupo 5′-fosforila. Além disso, as cadeias unidas pela ligase precisam estar em dupla hélice. Uma fonte de energia como o ATP ou NAD^+ é necessária para a reação de ligação, como será discutido no Capítulo 28.

E se o DNA-alvo não for naturalmente flanqueado pelos locais apropriados de restrição? Como o fragmento será cortado e ligado ao vetor? O método de extremidades coesivas pode ainda ser usado nestes casos por meio da adição de *pequenos ligantes de DNA quimicamente sintetizados*, que podem ser cortados por enzimas de restrição. Primeiramente, o ligante é covalentemente associado às extremidades de um fragmento de DNA. Por exemplo, a extremidade 5′ de um ligante decamérico e uma molécula de DNA são fosforilados por uma polinucleotídio quinase e então ligados pela ligase do fago T4 (Figura 5.11). Esta ligase pode formar uma ponte covalente entre as extremidades "cegas" das moléculas de DNA de dupla hélice. As extremidades coesivas são produzidas quando estas extensões de terminais são cortadas por enzimas de restrição apropriadas. Assim, *as extremidades coesivas correspondentes a uma enzima de restrição específica podem ser adicionadas a praticamente qualquer molécula de DNA.* Vemos aqui os frutos da combinação entre abordagens químicas sintéticas e enzimáticas na criação de novas moléculas de DNA.

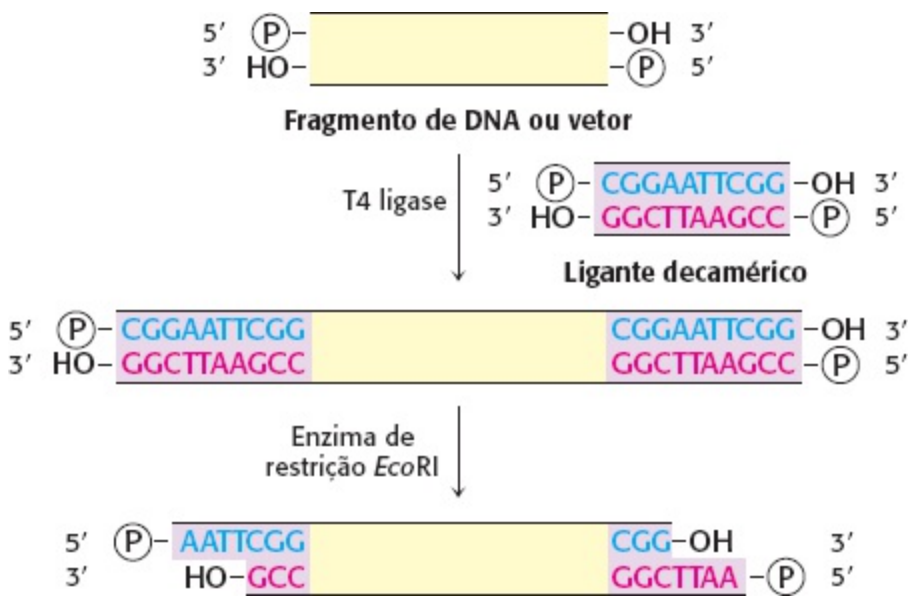


Figura 5.11 Formação das extremidades coesivas. As extremidades coesivas podem ser formadas pela adição e clivagem de ligantes quimicamente sintetizados.

Os plasmídios e o fago lambda são os vetores de escolha para a clonagem de DNA em bactérias

Muitos plasmídios e bacteriófagos foram engenhosamente modificados por pesquisadores para aumentarem a entrega de moléculas de DNA recombinante em bactérias e para facilitar a seleção de bactérias que abrigam estes vetores. Como já mencionado, os plasmídios são moléculas circulares de DNA de fita dupla que ocorrem naturalmente em algumas bactérias. Eles variam em tamanho de duas a várias centenas de quilobases. Os plasmídios transportam genes para a inativação de antibióticos, produção de toxinas e clivagem de produtos naturais. Estes cromossomos acessórios podem se replicar de maneira independente do cromossomo do hospedeiro. Ao contrário do genoma do hospedeiro, eles são dispensáveis sob certas circunstâncias. Uma célula bacteriana pode não ter plasmídio algum ou pode abrigar até mesmo 20 cópias de plasmídios.

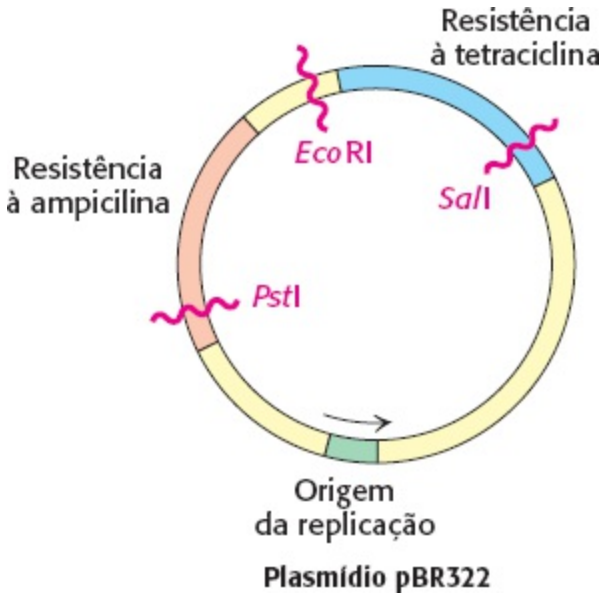


Figura 5.12 Mapa genético do plasmídio pBR322. O plasmídio transporta dois genes de resistência a antibióticos. Como todos os demais plasmídios, é um DNA circular de fita dupla.

Muitos plasmídios foram otimizados para uma tarefa experimental em particular. Por exemplo, uma classe de plasmídios, conhecidos como *vetores de clonagem*, são particularmente adequados para a rápida inserção e replicação de uma coleção de fragmentos de DNA. A criativa colocação, nestes plasmídios, de genes de resistência a antibióticos, de genes repórteres, ou de ambos, permite a rápida identificação daqueles vetores que abrigam a inserção de DNA desejado. Por exemplo, no *pbr322*, um dos primeiros plasmídios usados com esta função, a inserção do DNA no sítio de restrição *Sal*I ou *Bam*HI (Figura 5.12) inativa o gene para a resistência à tetraciclina, um efeito chamado de *inativação de inserção*. Células contendo o pBR322 com uma inserção de DNA em um destes sítios de restrição são resistentes à ampicilina, mas sensíveis à tetraciclina e, assim, podem ser prontamente selecionadas. Outra classe de plasmídios foi otimizada para uso como *vetores de expressão* para a produção de grandes quantidades de proteínas. Além dos genes de resistência a antibióticos, eles contêm sequências promotoras projetadas para direcionar a transcrição de grandes quantidades de uma sequência de DNA codificadora de proteínas. Em geral, estes vetores contêm sequências que flanqueiam o local de clonagem que simplificam a adição de marcadores fusionados à proteína de interesse (Seção 3.1), facilitando muito a purificação da proteína superexpressada. Ambos os tipos de vetores plasmidiais em geral têm uma região de *poliligação* (poliligante) que inclui muitos sítios de restrição exclusivos em sua sequência (Figura 5.13). Este poliligante pode ser clivado por muitas enzimas de restrição ou combinações de enzimas, fornecendo grande versatilidade aos fragmentos de DNA que podem ser inseridos.

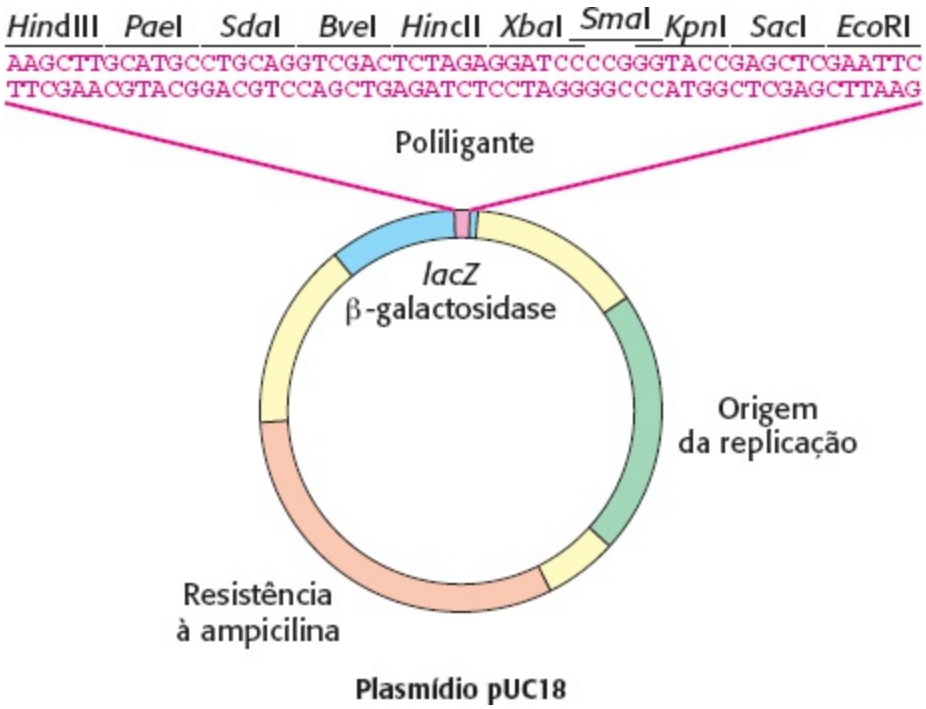


Figura 5.13 Um poliligante no plasmídio pUC18. O plasmídio pUC18 inclui um poliligante dentro de um gene para a β-galactosidase (geralmente chamado de gene *lσcZ*). A inserção de um fragmento de DNA em um dos muitos sítios de restrição neste poliligante pode ser detectada pela ausência da atividade da β-galactosidase.

Outro vetor amplamente utilizado, o *fago* λ, aproveita uma escolha de estilos de vida: este bacteriófago pode destruir seu hospedeiro ou pode se tornar parte dele (Figura 5.14). No *ciclo lítico*, as funções virais são totalmente expressas: o DNA viral e as proteínas são rapidamente produzidas e montadas em partículas virais, levando à lise (destruição) da célula hospedeira e ao súbito aparecimento de aproximadamente 100 partículas de vírus descendentes, ou *vírions*. No *ciclo*

lisogênico, o DNA do fago insere-se ao genoma do hospedeiro e pode ser replicado com o DNA do hospedeiro por muitas gerações, permanecendo inativo. Certas mudanças ambientais podem desencadear a expressão deste DNA viral inativo (dormente), levando à formação de vírus descendentes e à lise do hospedeiro. Grandes segmentos de DNA de 48 kb do fago λ não são essenciais à produção da infecção e podem ser substituídas por DNA exógeno, tornando o fago λ um vetor ideal.

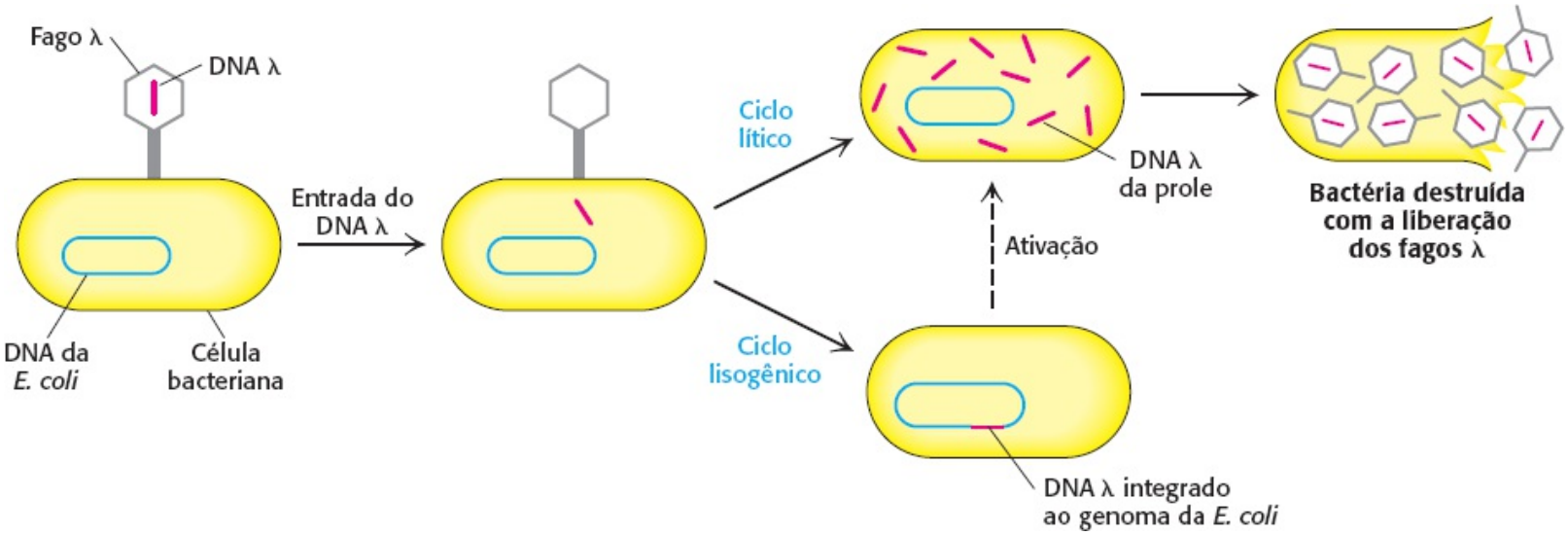


Figura 5.14 Vias alternativas de infecção do fago λ. O fago lambda pode se multiplicar em um hospedeiro e destruí-lo (ciclo lítico), ou seu DNA pode se integrar ao genoma do hospedeiro (ciclo lisogênico), onde se torna inativo (ou dormente) até ser ativado.

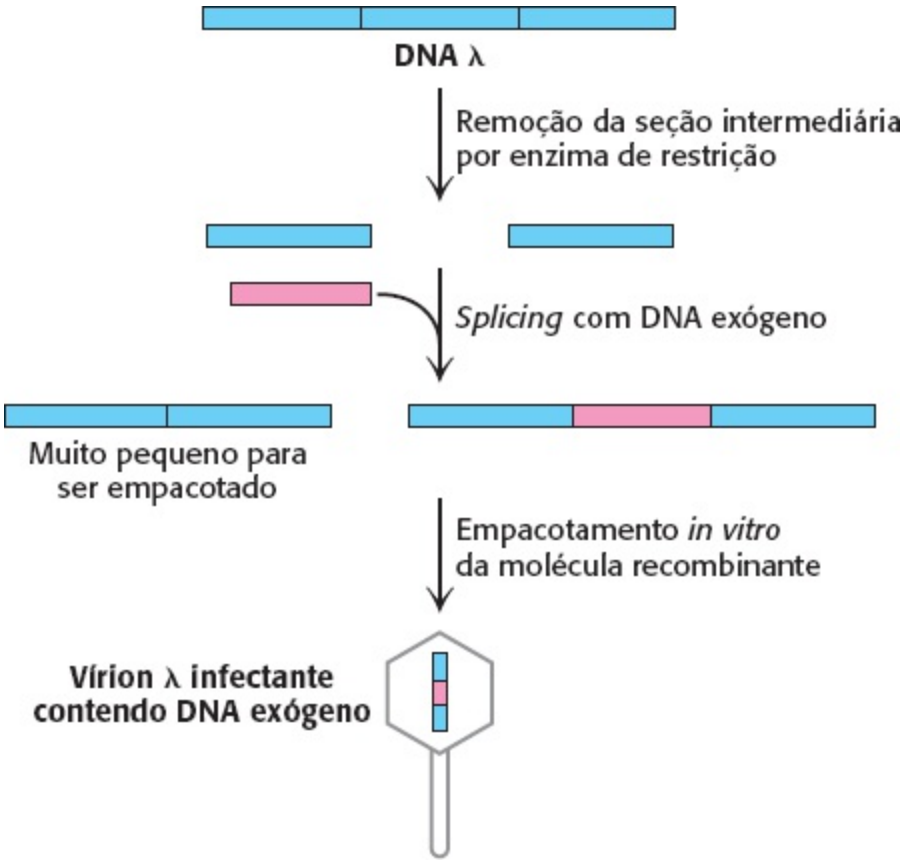


Figura 5.15 Fago λ mutante como um vetor de clonagem. O processo de empacotamento seleciona as moléculas de DNA que contêm a inserção.

Foram produzidos fagos λ mutantes projetados para clonagem. Um particularmente útil é chamado de λgt- λβ e contém dois sítios de clivagem *Eco*RI, em vez dos cinco normalmente presentes (Figura 5.15). Após a clivagem, o segmento intermediário da molécula de DNA deste λ pode ser removido. Os dois fragmentos de DNA restantes (chamados de "braços") combinados têm 72% do tamanho normal do genoma. Esta quantidade de DNA é muito pequena para ser empacotada em uma partícula λ, que pode armazenar de 78 a 105% de um genoma normal. No entanto, uma inserção adequadamente longa (como 10 kb) entre as duas extremidades do DNA λ permite que esta molécula recombinante (93% do tamanho normal) possa ser empacotada. Praticamente todas as partículas infecciosas formadas desta maneira terão a inserção de um fragmento de DNA exógeno. Outra vantagem da utilização destes vírus modificados é que eles entram em bactérias muito mais facilmente que os plasmídios. Entre as variedades de mutantes λ que foram projetados como vetores de clonagem, um deles, chamado de *cosmídeo*, é essencialmente um híbrido de um fago λ e um plasmídio e serve como vetor para grandes inserções de DNA (tão grandes quanto 45 kb).

Cromossomos artificiais de bactérias e leveduras

Pedaços muito maiores de DNA podem ser propagados por *cromossomos artificiais bacterianos* (BAC, do inglês *bacterial artificial chromosomes*) ou *cromossomos artificiais de leveduras* (YAC, do inglês *yeast artificial chromosomes*). Os BAC são versões altamente projetadas do fator de fertilidade da *E. coli* (fator F) que podem incluir inserções tão grandes quanto 300 kb. Os YAC contêm um centrômero, uma *sequência de replicação autônoma* (ARS, do inglês *autonomously replicating sequence*, onde a replicação tem início), um par de telômeros (extremidades usuais dos cromossomos de eucariotos), genes marcadores para seleção e um sítio de clonagem (Figura 5.16). Inserções tão grandes quanto de 1.000 kb podem ser clonadas em vetores YAC.

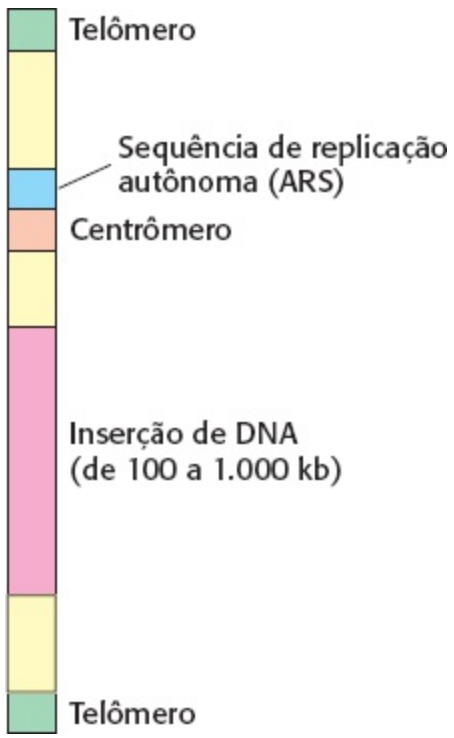


Figura 5.16 Diagrama de um cromossomo artificial de levedura (YAC). Estes vetores incluem as características necessárias para a replicação e estabilidade em células de levedura.

Genes específicos podem ser clonados a partir de digestos do DNA genômico

Métodos de clonagens e seleção engenhosos tornaram possível o isolamento de pequenos fragmentos de DNA em um genoma contendo mais do que 3×10^6 kb. A abordagem é preparar uma grande coleção (*biblioteca*) de fragmentos de DNA e então identificar aqueles membros da coleção que têm o gene de interesse. Portanto, para clonar o gene que está presente apenas uma vez em todo o genoma, dois componentes críticos têm que estar disponíveis: uma sonda de oligonucleotídios específica para o gene de interesse e uma biblioteca de DNA que possa ser rastreada rapidamente.

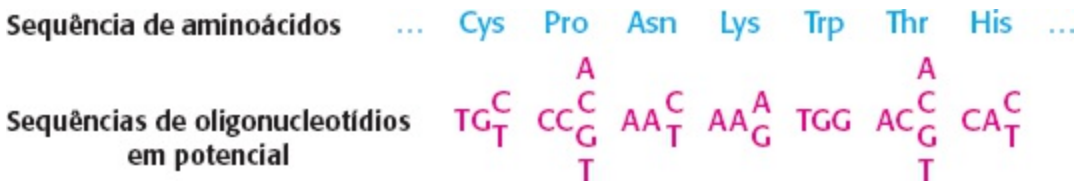


Figura 5.17 Sondas geradas a partir de uma sequência proteica. Uma sonda pode ser gerada por meio da síntese de todos os possíveis oligonucleotídios que codificam uma sequência específica de aminoácidos. Em razão da degeneração do código genético, 256 oligonucleotídios devem ser sintetizados para assegurar que a sonda compatível com a sequência de sete aminoácidos deste exemplo esteja presente.

Como uma sonda específica pode ser obtida? Em uma abordagem, uma sonda para um gene pode ser preparada se uma parte da sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene for conhecida. O sequenciamento de peptídios de uma proteína purificada (Capítulo 3) ou o conhecimento da sequência de proteínas homólogas de espécies relacionadas (Capítulo 6) são duas potenciais fontes deste tipo de informação. No entanto, surge um problema porque uma sequência de peptídios única pode ser codificada por um grande número de oligonucleotídios diferentes (Figura 5.17). Assim, para este propósito, as sequências de peptídios contendo triptofano e metionina são preferidas, porque estes aminoácidos são especificados por apenas um códon, enquanto os demais resíduos de aminoácidos têm entre dois e seis códons (ver Tabela 4.5). Todas as sequências de DNA (e seus complementos) que codificam a sequência peptídica selecionada são sintetizadas pelo método de fase sólida e marcadas radioativamente com ^{32}P em suas extremidades 5′.

Alternativamente, as sondas podem ser obtidas a partir do mRNA correspondente, proveniente de células nas quais ele é abundante. Por exemplo, precursores de eritrócitos contêm grandes quantidades de mRNA para a hemoglobina, e plasmócitos são ricos em mRNA para moléculas de anticorpos. Os mRNA destas células podem ser separados por tamanho para enriquecer o mRNA de interesse. Como será descrito em breve, o DNA complementar a este mRNA pode ser sintetizado *in vitro* e clonado para produzir uma sonda altamente específica.

Para preparar a biblioteca de DNA, uma amostra contendo muitas cópias do DNA genômico total é, em primeiro lugar, mecanicamente cisalhada ou parcialmente digerida em grandes fragmentos por enzimas de restrição (Figura 5.18). Este processo fornece uma população aproximadamente aleatória de fragmentos sobrepostos de DNA, os quais são então separados por eletroforese em gel para isolar os conjuntos de DNA que têm aproximadamente 15 kb de comprimento. Ligantes sintéticos são unidos às extremidades destes fragmentos, extremidades coesivas são formadas, e estes fragmentos são então inseridos em um vetor, como o DNA do fago λ, preparado com as mesmas extremidades coesivas. Bactérias *E. coli* são então infectadas com estes fagos recombinantes, que se replicam e então lisam as bactérias hospedeiras. O lisado resultante contém fragmentos de DNA humano

armazenado em quantidade suficiente de partículas virais para assegurar que praticamente todo o genoma esteja representado. Estes fagos constituem uma *biblioteca genômica*. Eles podem ser propagados indefinidamente, de modo que a biblioteca pode ser usada repetidamente por longos períodos.

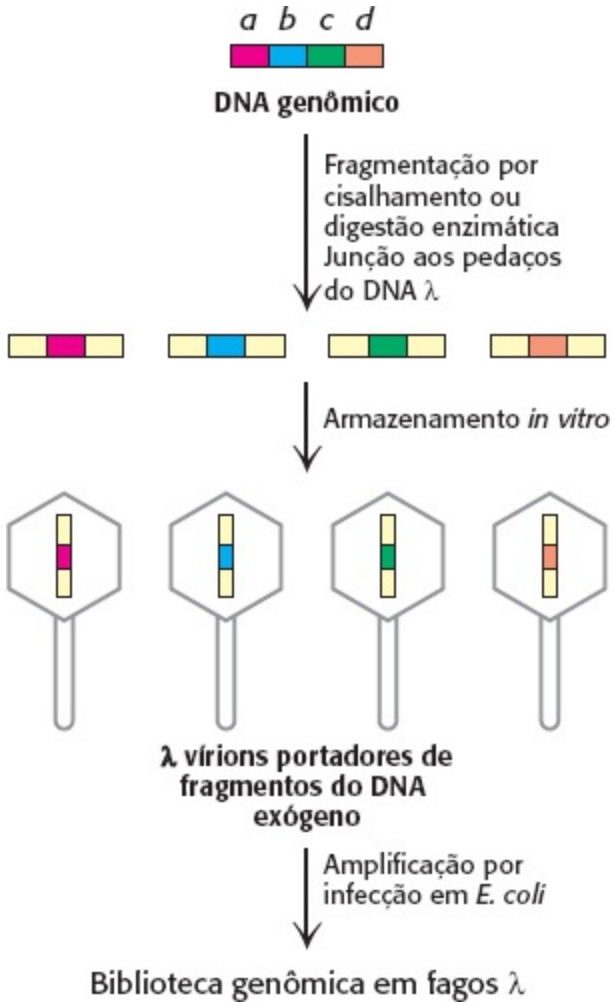


Figura 5.18 Criação de uma biblioteca genômica. Uma biblioteca genômica pode ser criada a partir dos digestos de um genoma completo. A partir da fragmentação do DNA genômico em segmentos sobrepostos, o DNA é inserido no vetor fago λ (mostrado em amarelo). O armazenamento nos vírions e a amplificação por infecção em *E. coli* fornecem a biblioteca genômica.

A biblioteca genômica é então rastreada para encontrar o número muito pequeno de fagos que contêm o gene de interesse. Para o genoma humano, mostra-se, por cálculo, que uma probabilidade de sucesso de 99% demanda a análise de 500.000 clones; portanto, é essencial que seja realizado um processo de rastreamento muito rápido e eficiente, como por hibridização do DNA.

Uma suspensão diluída de fagos recombinantes é inicialmente plaqueada em uma camada de bactérias (Figura 5.19), em uma placa de Petri. Onde cada partícula de fago aterrissou e infectou uma bactéria, uma *colônia* contendo fagos idênticos se desenvolve na placa de Petri. Uma réplica desta placa de Petri *mestre* é feita por meio da utilização de uma folha de nitrocelulose. As bactérias infectadas e o DNA dos fagos liberados pelas células lisadas aderem à nitrocelulose em um padrão de manchas correspondentes às *colônias*. As bactérias intactas na nitrocelulose são lisadas com NaOH, que também serve para desnaturar o DNA de modo que ele se torne acessível para a hibridização com a sonda marcada com ^{32}P. A presença de uma sequência de DNA específica em uma mancha em particular na réplica de nitrocelulose pode ser detectada usando-se uma molécula de

DNA ou RNA complementar radioativa como sonda. A autorradiografia depois revela a posição das manchas contendo o DNA recombinante. As *colônias* correspondentes são selecionadas da placa de Petri mestre e cultivadas. Um pesquisador sozinho pode analisar milhões de clones em um dia. Este método torna possível o isolamento de praticamente qualquer gene, desde que uma sonda esteja disponível.

DNA complementar preparado a partir do mRNA pode ser expresso em células hospedeiras

O preparo de bibliotecas de DNA eucariótico oferece desafios únicos, especialmente se o pesquisador estiver interessado principalmente em regiões codificantes de proteínas de um gene em particular. Lembre-se de que a maioria dos genes de mamíferos tem éxons e íntrons. Estes genes interrompidos não podem ser expressos em bactérias, que não têm a maquinaria para o *splicing* dos íntrons do transcrito primário. No entanto, esta dificuldade pode ser contornada fazendo-se com que as bactérias usem o DNA recombinante complementar ao mRNA, cujas sequências intrônicas já foram removidas.

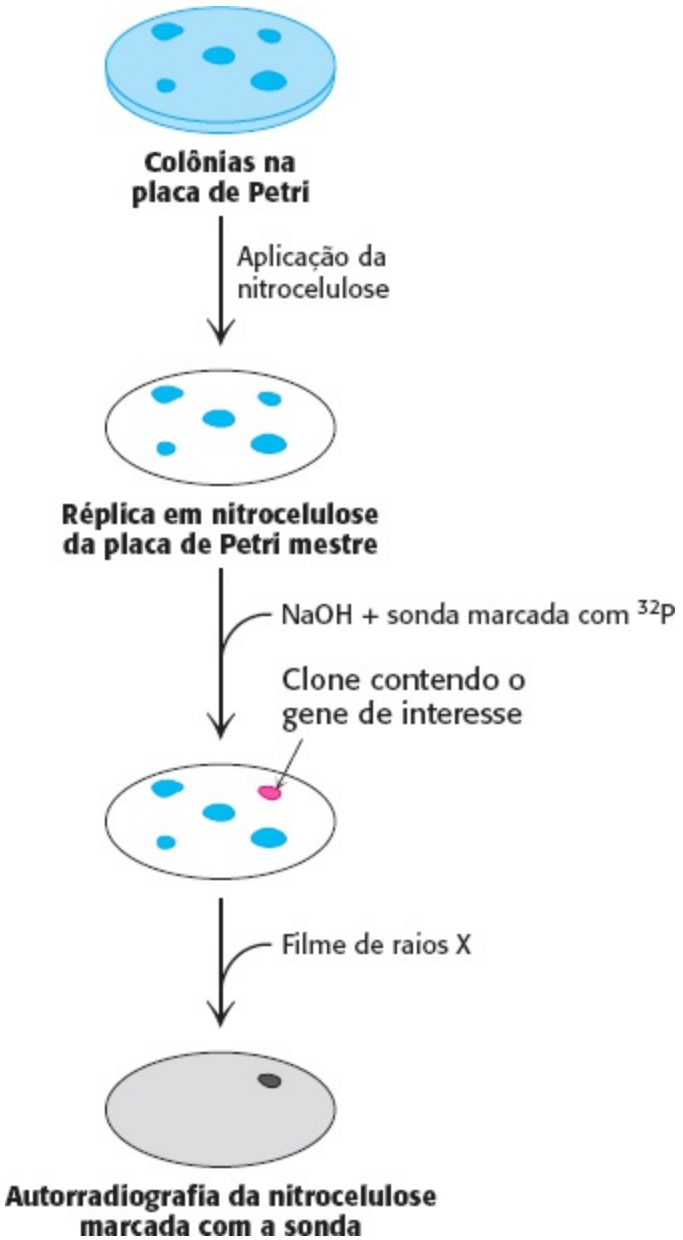


Figura 5.19 Rastreamento de uma biblioteca genômica por um gene específico. Aqui, uma placa de Petri é testada por colônias contendo o gene *a* da Figura 5.18.

O elemento essencial para a formação do *DNA complementar* é a enzima *transcriptase reversa*. Como discutido na Seção 4.3, um retrovírus usa esta enzima para formar um híbrido de DNA-RNA na replicação de seu RNA genômico. A transcriptase reversa sintetizará uma fita de DNA complementar a um molde de RNA, se a transcriptase for fornecida com um iniciador de DNA que pareie com o RNA e contenha um grupo 3 -OH livre. Podemos usar uma sequência simples de resíduos de timidinas repetitivas [oligo(T)] como iniciador. Esta sequência de oligo(T) pareia-se com a sequência poli(A) da extremidade 3′ da maioria das moléculas de mRNA eucarióticas (Seção 4.4), como mostrado na Figura 5.20. A transcriptase reversa então sintetiza o resto da fita de cDNA na presença dos quatro trifosfatos de desoxirribonucleosídios. A fita de RNA deste híbrido de RNA-DNA é subsequentemente hidrolisada ao aumentar o pH. Ao contrário do RNA, o DNA é resistente à hidrólise alcalina. A fita única de DNA é convertida em fita dupla de DNA por meio da criação de outro iniciador. A enzima *transferase terminal* adiciona nucleotídios – por exemplo, vários resíduos de dG – à extremidade 3′ do DNA. A oligo(dC) pode se ligar aos resíduos dG e iniciar a síntese da segunda fita de DNA. Ligantes sintéticos podem ser adicionados a este DNA de fita dupla para a ligação de um vetor adequado. Moléculas de DNA complementar para todos os mRNA de uma célula podem ser feitas, inseridas em vetores e então inseridas em bactérias. Esta coleção é chamada de *biblioteca de cDNA*.

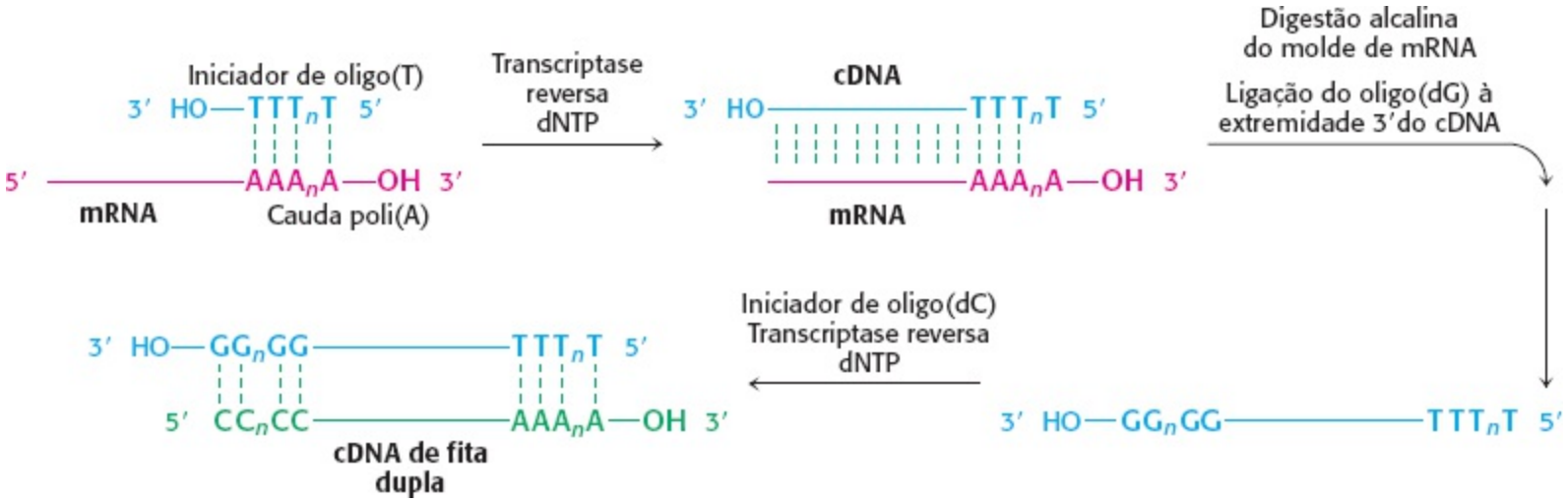


Figura 5.20 Formação de uma fita dupla de cDNA. Um DNA complementar (cDNA) em fita dupla é criado a partir do mRNA usando-se a transcriptase reversa para sintetizar uma fita de cDNA, primeiro sobre o modelo de mRNA e, então, após a digestão do mRNA, sobre a mesma fita de cDNA recémsintetizada.

Moléculas complementares de DNA podem ser inseridas em vetores de expressão para permitirem a produção da proteína de interesse correspondente. Clones de cDNA podem ser analisados com base na sua capacidade de direcionar a síntese de uma proteína exógena em bactérias, uma técnica conhecida como *clonagem de expressão*. Um anticorpo radioativo específico para a proteína de interesse pode ser usado para identificar as colônias de bactérias que expressam o produto proteico correspondente (Figura 5.21). Como descrito anteriormente, manchas de bactéria na réplica da placa de Petri são lisadas para liberarem suas proteínas, as quais se ligam ao filtro de nitrocelulose aplicado. Com a adição do anticorpo marcado com ^{125}I, específico para a proteína de interesse, a

autorradiografia revela a localização das colônias desejadas na placa de Petri mestre. Este rastreamento imunoquímico pode ser usado sempre que uma proteína for expressa e o anticorpo correspondente estiver disponível.

O DNA complementar tem muitas aplicações além da geração de bibliotecas genéticas. A superprodução e a purificação da maioria das proteínas eucarióticas em células procarióticas requerem a inserção de cDNA em vetores de plasmídio. Por exemplo, a proinsulina, um precursor da insulina, é sintetizada em bactérias portadoras de plasmídios que contêm DNA complementar ao mRNA da proinsulina (Figura 5.22). De fato, as bactérias produzem muito da insulina utilizada hoje por milhões de diabéticos.

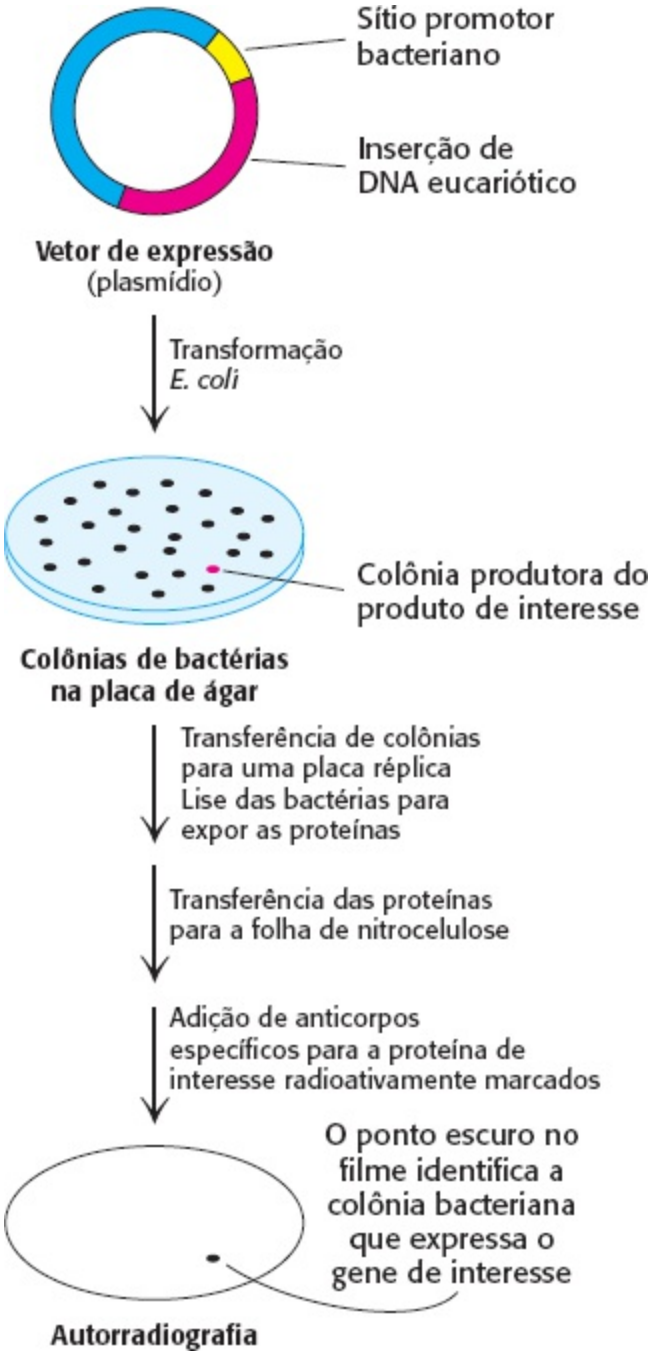


Figura 5.21 Rastreamento de clones de cDNA. Um método de rastreamento por clones de cDNA é identificar os produtos expressos com um anticorpo específico marcado.

Proteínas com novas funções podem ser criadas por meio de mudanças específicas no DNA

Muito aprendemos sobre os genes e proteínas ao analisarmos os efeitos que as mutações exercem em sua estrutura e função. Na abordagem genética clássica, as mutações são geradas de maneira aleatória ao longo do genoma de um organismo e aqueles indivíduos que exibem um fenótipo de interesse são selecionados. A análise destes mutantes então revela quais genes estão alterados, e o sequenciamento do DNA identifica a natureza precisa destas mudanças. *A tecnologia de DNA recombinante agora torna possível a criação de mutações específicas in vitro.* Podemos construir novos genes com as propriedades projetadas por meio de três mudanças dirigidas: *deleções, inserções e substituições*.

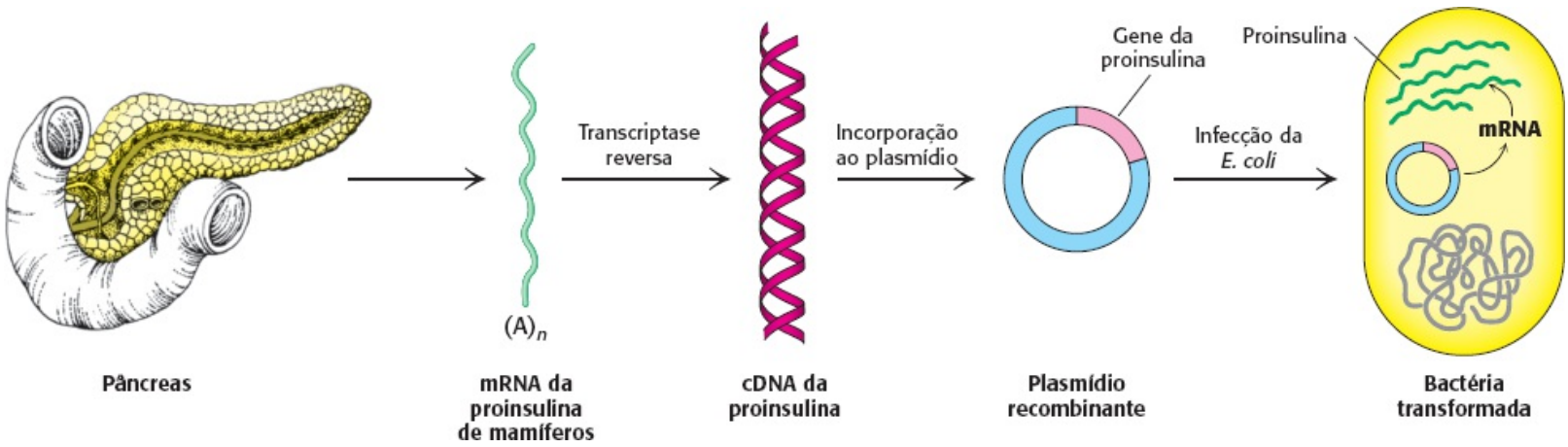


Figura 5.22 Síntese da proinsulina por bactérias. A proinsulina, um precursor da insulina, pode ser sintetizado por clones transformados (geneticamente alterados) de *E. coli*. Os clones contêm o gene da proinsulina de mamíferos.

Deleções. Uma deleção específica pode ser produzida por meio da clivagem de um plasmídio em dois sítios com uma enzima de restrição e religando-o para formar um círculo menor. Esta abordagem simples geralmente remove um grande bloco de DNA. Uma deleção menor pode ser feita ao cortar um plasmídio em um local único. As extremidades do DNA linear são então digeridas por uma exonuclease que remove os nucleotídios de ambas as fitas. O pedaço reduzido do DNA é então ligado para formar um círculo que carece de uma pequena extensão do DNA em torno do sítio de restrição.

Substituição: mutagênese sítio-dirigida. Proteínas mutantes com substituições de um único aminoácido podem ser prontamente produzidas por *mutagênese sítio-dirigida* (Figura 5.23). Suponha que queiramos substituir um resíduo específico de serina por uma cisteína. Esta mutação pode ser feita se (1) tivermos um plasmídio contendo o gene ou o cDNA para a proteína e (2) se soubermos a sequência de bases ao redor da localização a ser alterada. Se a serina de interesse for codificada por um TCT, a mutação da base central de C para G fornecerá o códon TGT, que codifica a cisteína. Este tipo de mutação é chamado de *mutação pontual* porque apenas uma base é alterada. Para introduzir esta mutação em nosso plasmídio, preparamos um inciador de oligonucleotídio que é complementar a esta região do gene, com a exceção de que ele contém TGT, em vez de TCT. As duas fitas do plasmídio são separadas e o iniciador é então pareado à fita complementar. O desencontro de 1 dos 15 pares de base é tolerado se o pareamento for conduzido em temperatura apropriada. Após o pareamento à fita complementar, o iniciador é alongado pela DNA polimerase, e o círculo da fita dupla é fechado adicionando-se DNA ligase. A replicação subsequente deste dúplex fornece dois tipos de prole de plasmídios, metade com a sequência original TCT e metade com a sequência

mutante TGT. A expressão do plasmídio contendo a nova sequência TGT produzirá uma proteína com a substituição desejada da cisteína pela serina em um local específico. Encontraremos muitos exemplos do uso de mutagênese sítio-dirigida para alterar precisamente regiões regulatórias de genes e para produzir proteínas com características sob medida.

Inserções: mutagênese de cassete. Na *mutagênese de cassete*, uma variedade de mutações, incluindo inserções, deleções e mutações multipontuais, podem ser introduzidas em um gene de interesse. Um plasmídio contendo o gene original é cortado com um par de enzimas de restrições para remover um pequeno segmento (Figura 5.24). Um oligonucleotídio de fita dupla sintético (o *cassete*) portando as alterações genéticas de interesse é preparado com as extremidades coesivas complementares às extremidades cortadas do plasmídio. A ligação do cassete ao plasmídio fornece o produto gênico mutado de interesse.

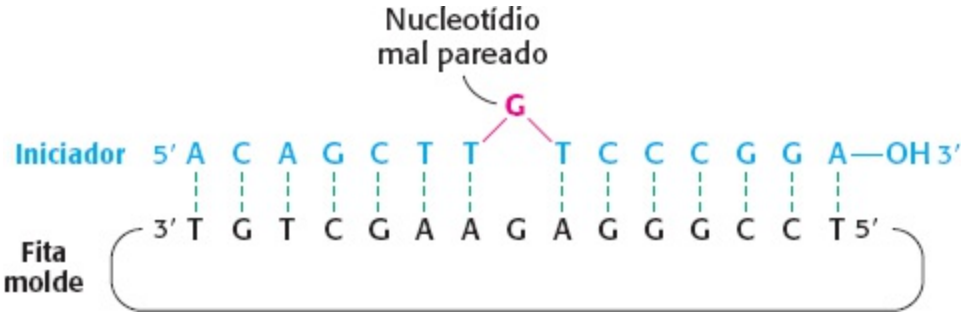


Figura 5.23 Mutagênese sítio-dirigida. Um iniciador contendo um nucleotídio mal pareado (descasado) é usado para produzir a mudança desejada na sequência de DNA.

Genes projetados. Novas proteínas podem ser criadas também por excisão conjunta de genes que codificam domínios que não estão associados na natureza. Por exemplo, o gene para um anticorpo pode ser unido ao gene de uma toxina para produzir uma proteína quimérica que mata as células que são reconhecidas pelo anticorpo. Estas *imunotoxinas* estão sendo avaliadas como agentes anticâncer. Além disso, proteínas de revestimento de vírus não infecciosas podem ser produzidas em grandes quantidades por métodos de DNA recombinante. Elas podem servir como *vacinas sintéticas* que são mais seguras que as vacinas convencionais preparadas por inativação dos vírus patogênicos. Uma subunidade do vírus da hepatite B produzida em levedura está provando ser uma vacina eficiente contra esta doença viral debilitante. Finalmente, genes completamente novos podem ser sintetizados de novo pelo método de fase sólida. Estes genes podem codificar proteínas que não têm correlatos na natureza.

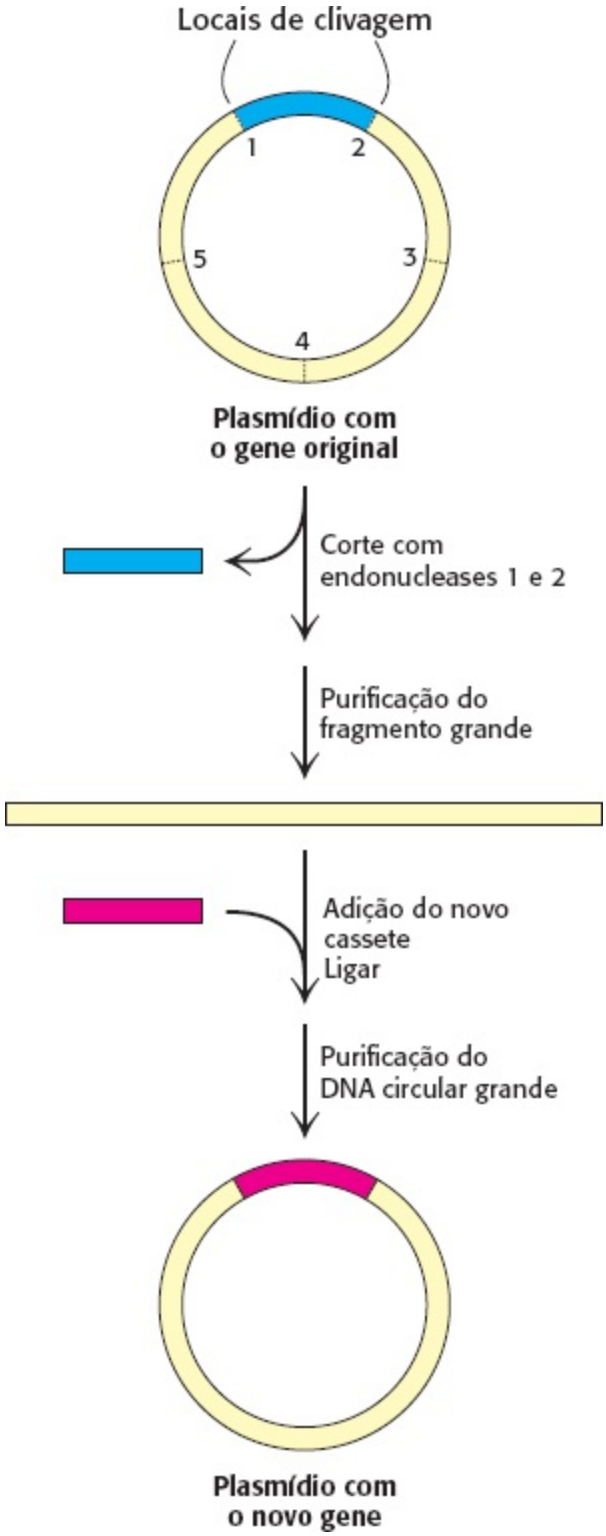


Figura 5.24 Mutagênese de cassete. O DNA é clivado em um par de locais específicos de restrição por duas diferentes endonucleases de restrição. Um oligonucleotídio sintético com extremidades que são complementares a estes locais (o cassete) é então ligado ao DNA clivado. O método é altamente versátil porque o DNA inserido pode ter qualquer sequência desejada.

Métodos recombinantes permitem a exploração de efeitos funcionais das mutações que causam doenças

A aplicação da tecnologia de DNA recombinante à produção de proteínas com mutações teve efeito significativo no estudo da ELA. Lembre-se de que os estudos genéticos identificaram um número de mutações indutoras da ELA no gene que codifica a superóxido dismutase Cu/Zn. Como iremos aprender na Seção 18.3, a SOD1 catalisa a conversão do radical aniônico supeóxido em peróxido de

hidrogênio, o qual, por sua vez, é convertido em oxigênio molecular e água pela catalase. Para estudar o efeito potencial das mutações causadoras da ELA sobre a estrutura e função da SOD1, o gene *SOD1* foi isolado de uma biblioteca de cDNA humana e amplificado por PCR. Os fragmentos amplificados contendo o gene foram então digeridos com uma enzima de restrição apropriada e inseridos em um vetor de plasmídio tratado da mesma maneira. As mutações correspondentes àquelas observadas em pacientes com ELA foram introduzidas nestes plasmídios por mutagênese sítio-dirigida, e a os produtos proteicos foram expressos e ensaiados para atividade enzimática. Surpreendentemente, estas mutações não alteraram significativamente a atividade enzimática das proteínas recombinantes correspondentes. Com estas observações, acredita-se que estas mutações conferem propriedades tóxicas à SOD1. Embora a natureza desta toxicidade não seja completamente conhecida, uma hipótese é de que a SOD1 mutante tenha mais tendência a formar agregados tóxicos no citoplasma de células neuronais.

5.3 Genomas completos foram sequenciados e analisados

Os métodos recém-descritos são extremamente efetivos para o isolamento e a caracterização de fragmentos de DNA. No entanto, os genomas de organismos diferentes como os vírus e os seres humanos contêm sequências maiores de DNA, organizadas de maneiras muito específicas, cruciais para suas funções integradas. É possível sequenciar genomas completos e analisá-los? Para pequenos genomas, este sequenciamento foi conseguido logo após o desenvolvimento dos métodos de sequenciamento do DNA. Sanger e colaboradores determinaram a sequência completa das 5.386 bases no DNA do vírus ϕX174 em 1977, apenas um quarto de século após a elucidação de Sanger sobre a sequência de aminoácidos de uma proteína. Esta proeza foi seguida, anos depois, pela determinação da sequência do DNA mitocondrial humano, uma molécula de DNA circular em fita dupla contendo 16.569 pares de base. Ela codifica 2 RNA ribossomais mitocondriais, 22 RNA de transferência (ou transportador) e 13 proteínas. Muitos outros genomas virais foram sequenciados nos anos subsequentes. No entanto, os genomas de organismos de vida livre apresentaram um grande desafio porque mesmo o mais simples é constituído por mais de 1 milhão de pares de base. Desta maneira, os projetos de sequenciamento exigem tanto as técnicas de sequenciamento rápido quanto métodos eficientes para unir pequenos trechos de 300 a 500 pares de base em uma sequência completa.

Os genomas dos organismos de bactérias a eucariotos multicelulares foram sequenciados

Com o desenvolvimento dos sequenciadores automáticos de DNA com base nos terminadores de cadeia didesoxinucleotídios fluorescentes, o sequenciamento rápido de grandes quantidades de DNA tornou-se realidade. A sequência do genoma da bactéria *Haemophilus influenzae* foi determinada em 1995 por meio da abordagem da "*shotgun*". O DNA genômico foi cortado aleatoriamente em fragmentos que foram então sequenciados. Por meio de programas de computador montou-se a sequência completa por comparação das regiões de sobreposição dos fragmentos. O genoma de *H. influenzae* tem 1.830.137 pares de base e codifica aproximadamente 1.740 proteínas (Figura 5.25). Usando abordagens similares, os pesquisadores determinaram as sequências de mais de 100 espécies

de bactérias e arqueias, incluindo organismos-modelo importantes como a *E. coli, Salmonella typhimurium* e *Archaeoglobus fulgidus*, assim como organismos patogênicos como *Yersinia pestis* (causadora da peste bubônica) e o *Bacillus anthracis* (antraz).

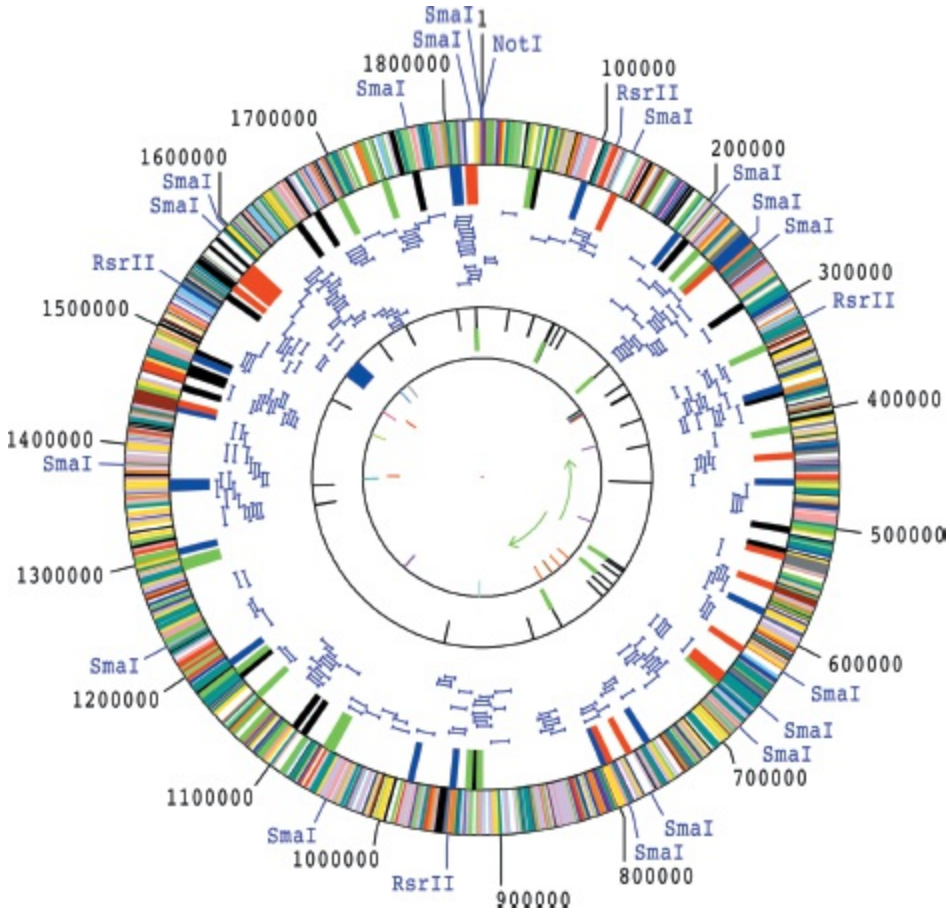


Figura 5.25 Um genoma completo. O diagrama representa o genoma de *Haemophilus influenzae*, o primeiro genoma completo de um organismo de vida livre a ser sequenciado. O genoma codifica mais de 1.700 proteínas e 70 moléculas de RNA. A função mais provável de aproximadamente metade das proteínas foi determinada por comparações com sequências de proteínas já caracterizadas em outras espécies. [De R. D. Fleischmann *et al.*, *Science* 269:496-512, 1995; cópia de cortesia de The Institute for Genomic Research.]

O primeiro genoma eucariótico a ser completamente sequenciado foi o da levedura de padeiro *Saccharomyces cerevisiae,* em 1996. O genoma da levedura tem aproximadamente 12 milhões de pares de base, distribuídos em 16 cromossomos, e codifica mais de 6.000 proteínas. Este êxito foi seguido, em 1998, pela primeira codificação completa do genoma de um organismo multicelular, o nematódeo *Caenorhabditis elegans*, que contém 97 milhões de pares de bases. Este genoma inclui mais de 19.000 genes. Os genomas de muitos outros organismos amplamente utilizados na pesquisa biológica e biomédica já foram sequenciados, incluindo aqueles da mosca da banana *Drosophila melanogaster,* da planta modelo *Arabidopsis thaliana*, do camundongo, do rato e do cão. Observe que o sequenciamento de um genoma complexo tem várias etapas entre os estágios de "rascunho", "completo" e o "finalizado". Mesmo após a sequência ser declarada "finalizada", algumas seções do sequenciamento do DNA, como as sequências repetitivas que constituem a heterocromatina, podem estar ausentes, porque estas sequências são muito difícéis de manipular por meio das técnicas usuais.

O sequenciamento do genoma humano foi finalizado

O objetivo final de boa parte das pesquisas em genômica foi o de sequenciar e analisar o genoma humano. Considerando que o genoma humano tem aproximadamente 3 bilhões de pares de base no DNA, distribuídos em 24 cromossomos, o desafio de conseguir a sequência completa foi enorme. No entanto, por meio de um esforço internacional entre laboratórios acadêmicos e companhias privadas, o genoma humano progrediu de um rascunho, inicialmente divulgado em 2001, à sequência finalizada descrita em 2004 (Figura 5.26).

O genoma humano é uma rica fonte de informações sobre muitos aspectos da humanidade, incluindo a bioquímica e a evolução. A análise do genoma continuará por anos adiante. O desenvolvimento de um banco de dados dos genes codificadores de proteínas é uma destas tarefas. No início do projeto de sequenciamento do genoma, o número de tais genes era estimado em aproximadamente 100.000. Com a disponibilidade do genoma completo (mas não finalizado), esta estimativa foi reduzida para algo entre 30.000 e 35.000. Com a sequência finalizada, a estimativa caiu para de 20.000 a 25.000. Usaremos a estimativa de 23.000 ao longo deste livro. A redução destas estimativas foi devida, parcialmente, à percepção de que há um grande número de *pseudogenes*, muitos dos quais foram anteriormente genes funcionais que sofreram mutações e não são mais expressos. Por exemplo, mais da metade das regiões genômicas que correspondem aos receptores olfatórios – moléculas-chave responsáveis pelo nosso sentido de olfato – são pseudogenes (Seção 33.1). As regiões correspondentes nos genomas de outros primatas e roedores codificam receptores olfatórios funcionais. No entanto, o número surpreendentemente pequeno de genes contradiz a complexidade do proteoma humano. *Muitos genes codificam mais de uma proteína, por meio de mecanismos como splicing alternativo do mRNA e modificações pós-traducionais das proteínas.* As proteínas diferentes codificadas por apenas um gene em geral apresentam variações importantes em suas propriedades funcionais.

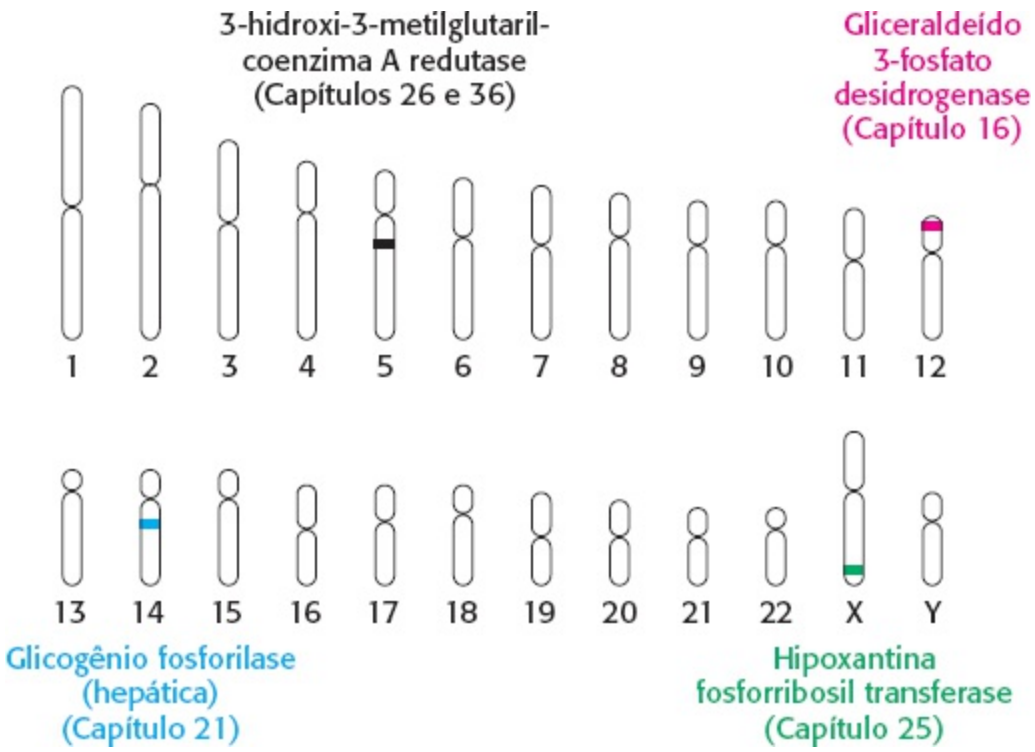


Figura 5.26 O genoma humano. O genoma humano é organizado em 46 cromossomos – 22 pares de autossomos e os cromossomos sexuais X e Y. As localizações de muitos genes associados a importantes vias bioquímicas estão destacadas.

O genoma humano contém uma grande quantidade de DNA que não codifica proteínas. Um grande desafio da bioquímica moderna e da genética é elucidar os papéis do DNA não codificante. Muito deste DNA está presente por conta dos *elementos genéticos móveis*. Estes elementos, relacionados com os retrovírus (Seção 4.3) foram sendo inseridos no genoma ao longo do tempo; muitos acumularam mutações e não são mais funcionais. Mais de 1 milhão de *sequências Alu*, cada uma com aproximadamente 300 bases de extensão, estão presentes no genoma humano. As sequências *Alu* são exemplos de *SINES, elementos intercalados curtos* (do inglês *short interspersed elements*). O genoma humano também inclui cerca de 1 milhão de *LINES, elementos intercalados longos* (do inglês *long interspersed elements*), sequências de DNA que podem ser tão extensas quanto 10 pares de quilobases (kpb). As funções destes elementos como parasitos genéticos neutros ou instrumentos na evolução do genoma estão atualmente sob investigação.

Os métodos de sequenciamento de "nova geração" permitem a rápida determinação da sequência completa de um genoma

Desde a introdução do método didesoxi de Sanger por volta da década de 1970, houve avanços significativos nas tecnologias de sequenciamento de DNA, permitindo a leitura de sequências progressivamente mais extensas com maior fidelidade e em menor tempo. O recente desenvolvimento dos métodos de sequenciamento de "nova geração" estendeu esta capacidade a níveis anteriormente não imaginados. Combinando descobertas tecnológicas na manipulação de pequenas quantidades de líquido, óptica de alta resolução e poder de computação, estes métodos permitem o sequenciamento paralelo de mais de 400.000 fragmentos de DNA individuais, com muitas centenas de pares de base em cada fragmento. Deste modo, um único experimento de sequenciamento de 10 h pode gerar mais de 100.000.000 de bases (100 megabases). Embora ainda haja obstáculos significativos, esta capacidade de sequenciamento sugere que o rápido sequenciamento do genoma de qualquer pessoa, a baixo custo, é uma possibilidade bem real. As sequências de genomas individuais fornecerão informações sobre as variações genéticas dentro de populações e podem conduzir à era da medicina personalizada, quando estes dados poderão ser usados para guiar decisões terapêuticas.

A genômica comparativa tornou-se uma poderosa ferramenta de pesquisa

Comparações entre genomas de diferentes organismos são uma fonte de ideias sobre o genoma humano. O sequenciamento do genoma do chimpanzé, nosso parente mais próximo, está em vias de finalização. Os genomas de outros mamíferos que são amplamente utilizados na pesquisa biológica, como o camundongo e o rato, foram finalizados. As comparações revelam que 99% dos genes humanos têm correlatos nos genomas destes roedores. No entanto, tais genes foram substancialmente reorganizados entre os cromossomos e estima-se que se passaram 75 milhões de anos de evolução desde que humanos e roedores tiveram um ancestral comum (Figura 5.27).

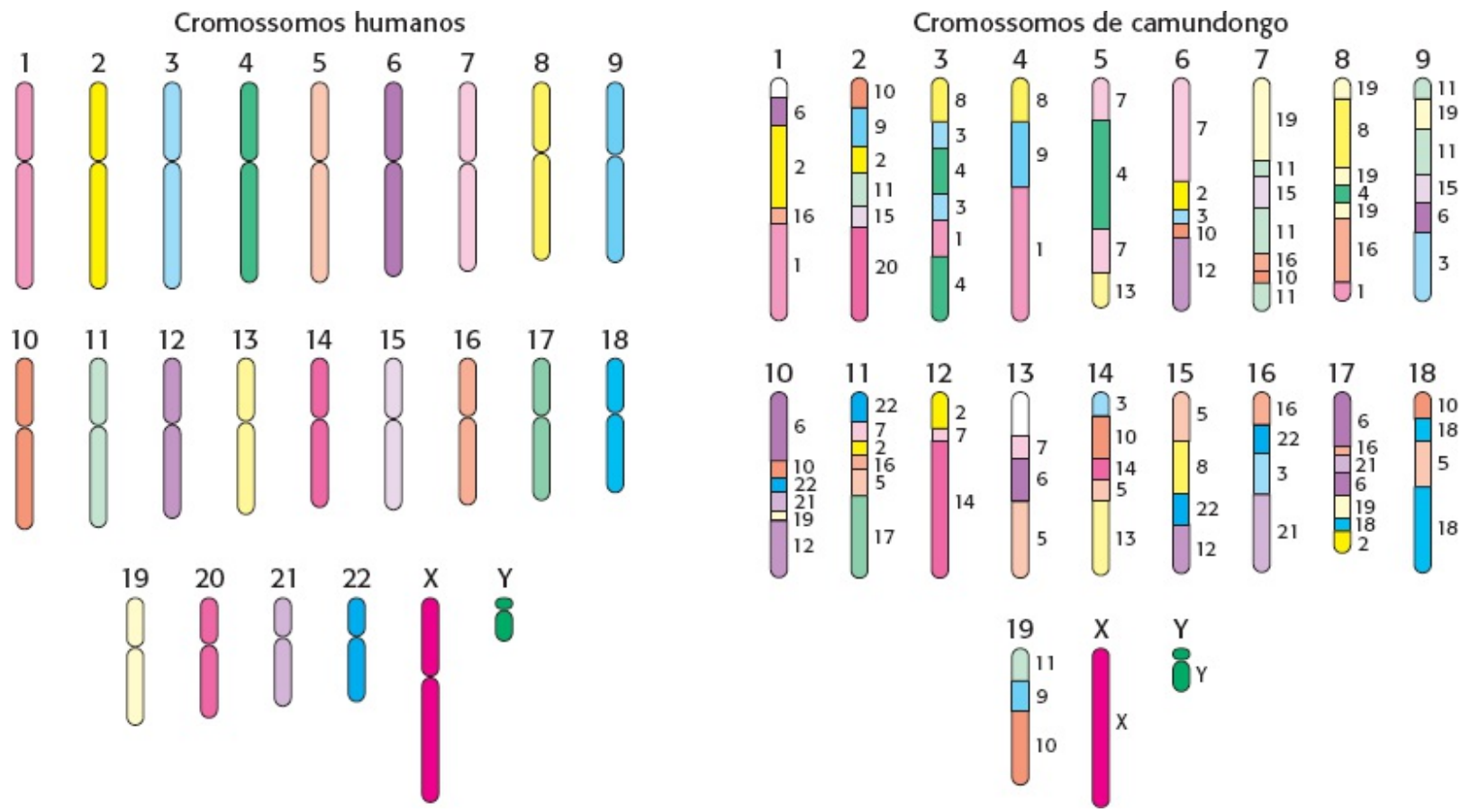
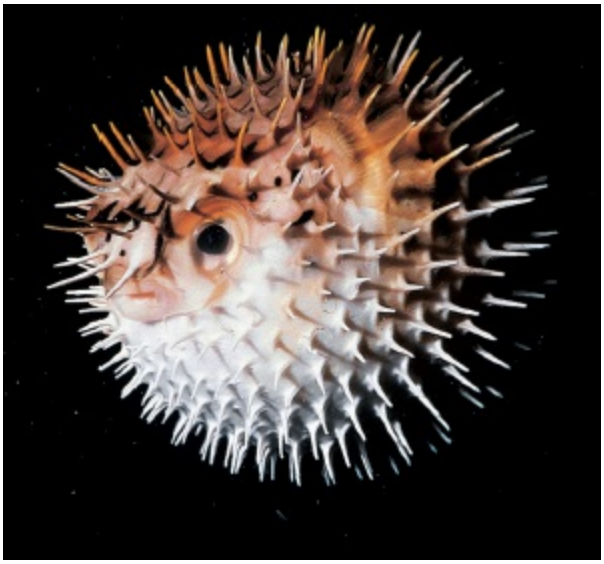


Figura 5.27 Comparação entre genomas. Uma comparação esquemática do genoma humano e do genoma do camundongo mostra a reorganização de grandes fragmentos de cromossomos.

Os genomas de outros organismos também foram determinados especificamente para o uso na genômica comparativa. Por exemplo, os genomas de duas espécies de baiacus, *Takifugu rubripes* e *Tetraodon nigrovidis,* foram determinados. Estes genomas foram selecionados porque eles são bem pequenos e carecem do DNA intergênico presente em abundância no genoma humano. Os genomas dos baiacus incluem menos de 400 pares de megabases (Mpb), um oitavo do número no genoma humano, mas ainda assim os genomas de baiacus e humano contêm essencialmente o mesmo número de genes. A comparação entre os genomas destas espécies com o genoma humano revelou mais de 1.000 genes humanos antes não reconhecidos. Além disso, a comparação entre duas espécies de baiacus, que tiveram um ancestral comum há 25 milhões de anos, é uma fonte de ideias sobre eventos mais recentes na evolução. A genômica comparada é uma ferramenta poderosa, tanto para interpretar o genoma humano quanto para entender os principais eventos na origem dos gêneros e espécies.



Um baiacu. [Fred Bavendam/Peter Arnold.]

5.4 Genes eucarióticos podem ser quantificados e manipulados com considerável precisão

Após um gene de interesse ter sido identificado, clonado e sequenciado, é geralmente desejável entender como este gene e seu produto proteico correspondente funcionam no contexto global da célula ou organismo. Agora é possível determinar como a expressão de um gene em particular é regulada, como as mutações no gene afetam a função do produto proteico correspondente e como o comportamento da célula como um todo, ou do organismo-modelo, é alterado pela introdução de mutações em genes específicos. Níveis de transcrição de grandes famílias de genes dentro de células e tecidos podem ser prontamente quantificados e comparados entre várias condições ambientais possíveis. Genes eucarióticos podem ser introduzidos em bactérias, e as bactérias podem ser usadas como fábricas para produzir um produto proteico desejado. O DNA também pode ser introduzido em células de organismos superiores. Genes introduzidos em animais são ferramentas valiosas para examinar a ação de um gene, e eles são a base da terapia gênica. Os genes introduzidos em plantas podem fazê-las resistentes às pragas, ou capazes de crescer em condições desfavoráveis, ou, ainda, torná-las capazes de armazenar quantidades maiores de nutrientes essenciais. A manipulação de genes eucarióticos é muito promissora como fonte de benefícios médicos e agronômicos, mas também é fonte de controvérsias.

Níveis de expressão gênica podem ser examinados detalhadamente

A maioria dos genes está presente na mesma quantidade em todas as células – de fato, uma cópia por célula haploide ou duas cópias por célula diploide. No entanto, o nível de expressão de cada gene, indicado pela quantidade de mRNA, pode variar amplamente entre nenhuma expressão e centenas de cópias de mRNA por célula. O padrão de expressão gênica varia entre tipos celulares, distinguindo, por exemplo, um músculo de um neurônio. Mesmo dentro da mesma célula, os níveis de expressão gênica podem variar à medida que a célula responde a diferentes circunstâncias fisiológicas. Observe que os níveis de mRNA por vezes se correlacionam com os níveis de proteínas expressas, mas esta correlação nem sempre se estabelece. Assim, deve-se manter a cautela ao interpretar os

resultados dos níveis isolados de mRNA.

A quantidade de transcritos individuais de mRNA pode ser determinada por *PCR quantitativa* (qPCR), ou PCR em tempo real. O RNA é primeiramente isolado da célula ou tecido de interesse. Com o uso da transcriptase reversa, o cDNA é preparado a partir da amostra de RNA. Em uma abordagem de qPCR, o transcrito de interesse é amplificado por PCR com os iniciadores apropriados na presença do corante SYBR Verde I, que brilha intensamente quando ligado ao DNA de fita dupla. Nos ciclos iniciais de PCR, não há fitas duplas suficientes para permitir um sinal de fluorescência. No entanto, após repetitivos ciclos de PCR, a intensidade de fluorescência excede os limites da detecção e continua a aumentar à medida que o número de fitas duplas correspondentes ao transcrito de interesse aumenta (Figura 5.28). É importante observar que o número do ciclos no qual a fluorescência se torna detectável acima de um limiar definido (ou C_τ) é indiretamente proporcional ao número de cópias no molde original. Após a relação entre o número de cópias originais e o C_τ ter sido estabelecido com o uso dos valores padronizados, os experimentos subsequentes de qPCR podem ser utilizados para determinar o número de cópias de qualquer transcrito de interesse na amostra original, desde que os inciadores adequados estejam disponíveis.

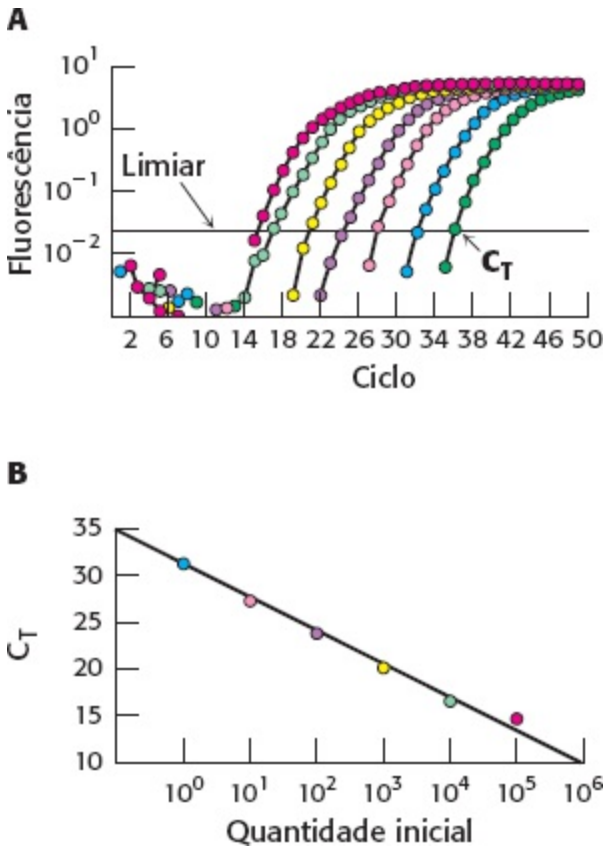


Figura 5.28 PCR quantitativa. **A.** Na qPCR, a fluorescência é monitorada ao longo do curso da amplificação da PCR para a determinação do C_T, o ciclo no qual o sinal excede um limiar definido. Cada cor representa uma quantidade inicial de DNA diferente. **B.** Os valores de C_T são inversamente proporcionais ao número de cópias do molde original de cDNA. [Segundo N. J. Walker, *Science* 296:557-559, 2002.]

Embora o qPCR seja uma técnica poderosa para a quantificação de pequenos números de transcritos em um dado experimento, podemos agora usar nosso conhecimento sobre sequências completas do genoma para investigar um *transcriptoma* completo, o padrão e nível de expressão de todos os genes de uma célula ou tecido em particular. Um dos métodos mais poderosos desenvolvidos até o momento para este propósito é fundamentado na hibridização. Oligonucleotídios

ou cDNA são fixados em um suporte sólido como em uma lâmina de microscópio, criando um microarranjo de DNA (ou *chip* de DNA). O cDNA marcado com fluorescência é hibridizado à lâmina para revelar o nível de expressão de cada gene, identificado por sua própria posição no *chip* (Figura 5.29). A intensidade do ponto de fluorescência no *chip* revela o nível de transcrição de um gene específico. *Chips* de DNA foram preparados com oligonucleotídios complementares a todos os genes codificadores de proteínas, 6.200 ao total, dentro do genoma da levedura (Figura 5.30). Uma análise dos conjuntos de mRNA com o uso destes *chips* revelou, por exemplo, que aproximadamente 50% de todos os genes da levedura são expressos em níveis basais de 0,1 a 1,0 cópia de mRNA por célula. Este método rapidamente detectou variações nos níveis de expressão exibidos por genes específicos sob diferentes condições de crescimento.

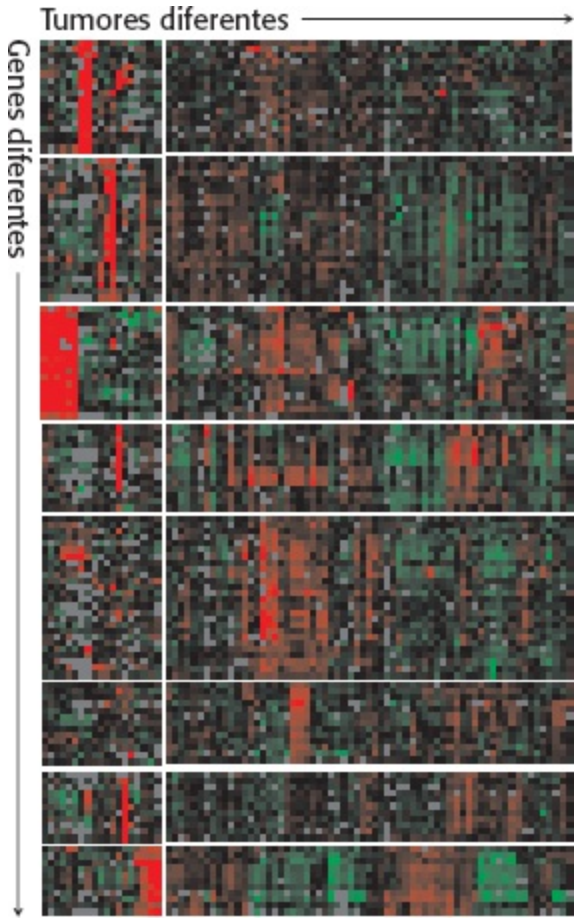


Figura 5.29 Análise da expressão gênica com o uso de microarranjos. Os níveis de expressão de milhares de genes podem ser simultaneamente analisados por meio do uso de microarranjos de DNA (*chips* de DNA). Aqui, uma análise de 1.733 genes em 84 amostras de câncer de mama revela que os tumores podem ser divididos em classes diferentes de acordo com seus padrões de expressão gênica. O vermelho corresponde à indução gênica, e o verde, à repressão. [Segundo C. M. Perou *et al., Nature* 406:747-752, 2000.]

Análises de microarranjos podem ser bastante informativas no estudo comparativo das mudanças de expressão gênica entre mamíferos enfermos e seus correlatos saudáveis. Como mencionado anteriormente, embora as mutações patogênicas causadoras da ELA no gene *SOD1* tenham sido identificadas, o mecanismo pelo qual a proteína mutante SOD1 leva de fato à perda dos neurônios motores permanece um mistério. Muitos grupos de pesquisa têm usado análises de microarranjos de neurônios isolados de humanos e camundongos portadores das mutações *SOD1* para buscar pistas sobre as vias da progressão da doença e para sugerir possíveis alternativas de tratamento. Estes trabalhos implicaram a participação de uma variedade de vias bioquímicas, incluindo a ativação

imunológica, o manejo do estresse oxidativo e a degradação de proteínas na resposta celular às formas mutantes e tóxicas de SOD1.

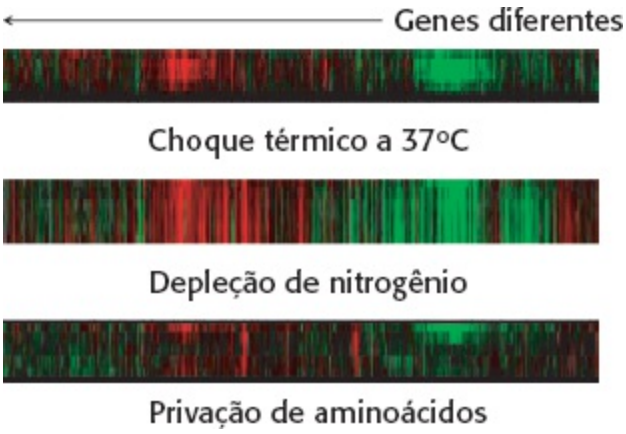


Figura 5.30 Monitoramento de mudanças na expressão gênica de leveduras. Esta análise de microarranjo mostra níveis da expressão gênica de genes de levedura sob diferentes condições. [Segundo V. R. Iyer *et al. Nature* 409:533-538, 2001.]

Novos genes inseridos em células eucarióticas podem ser expressos de maneira eficiente

Bactérias são os hospedeiros ideais para a amplificação de moléculas de DNA. Elas também podem servir como fábricas para a produção de uma ampla variedade de proteínas eucarióticas e procarióticas. No entanto, as bactérias carecem das enzimas necessárias para proceder às modificações pós-traducionais como a clivagem específica de polipeptídios e a incorporação de unidades de carboidratos. Assim, muitos genes eucarióticos só podem ser expressos adequadamente em células hospedeiras eucarióticas. A introdução de moléculas de DNA recombinante em células de organismos superiores também pode ser uma fonte de ideias sobre como seus genes são organizados e expressos. Como são ligados e desligados os genes durante o desenvolvimento embrionário? Como um óvulo fertilizado dá origem a um organismo com células altamente diferenciadas que são organizadas no tempo e no espaço? Estas perguntas centrais da biologia podem ser abordadas produtivamente por meio da expressão de genes exógenos em células de mamíferos.

As moléculas de DNA recombinante podem ser introduzidas nas células animais de várias formas. Em um método, as moléculas exógenas de DNA, precipitadas por fosfato de cálcio, são absorvidas pela célula. Uma pequena fração do DNA importado integra-se de maneira estável ao DNA cromossômico. A eficiência da incorporação é baixa, mas o método é útil porque é facilmente aplicável. Em outro método, o DNA é *microinjetado* nas células. Uma micropipeta de vidro de ponta muito fina (0,1 mm de diâmetro) contendo uma solução de DNA exógeno é inserida em um núcleo (Figura 5.31). Um pesquisador hábil pode injetar centenas de células por hora. Cerca de 2% das células de camundongo injetadas são viáveis e contêm o novo gene. O terceiro método utiliza vírus para a introdução de novos genes dentro de células animais. Os vetores mais eficientes são os *retrovírus*, que replicam por meio de intermediários do DNA, o inverso do fluxo normal da informação. Uma característica notável do ciclo de vida de um retrovírus é que a forma em dupla hélice do DNA de seu genoma, produzida pela ação da transcriptase reversa, incorpora-se aleatoriamente ao DNA cromossômico dos seus hospedeiros. Esta versão de DNA do genoma viral, chamada de *DNA proviral*, pode ser expressa eficientemente pela célula hospedeira e ser replicada

em conjunto com o DNA normal da célula. Os retrovírus em geral não matam seus hospedeiros. Genes exógenos têm sido introduzidos de maneira eficiente em células de mamíferos por meio da infecção destas com vetores derivados dos *vírus da leucemia murina de Moloney*, que pode aceitar inserções tão longas quanto 6 kb. Alguns genes introduzidos por este vetor retroviral no genoma de uma célula hospedeira transformada são eficientemente expressos.

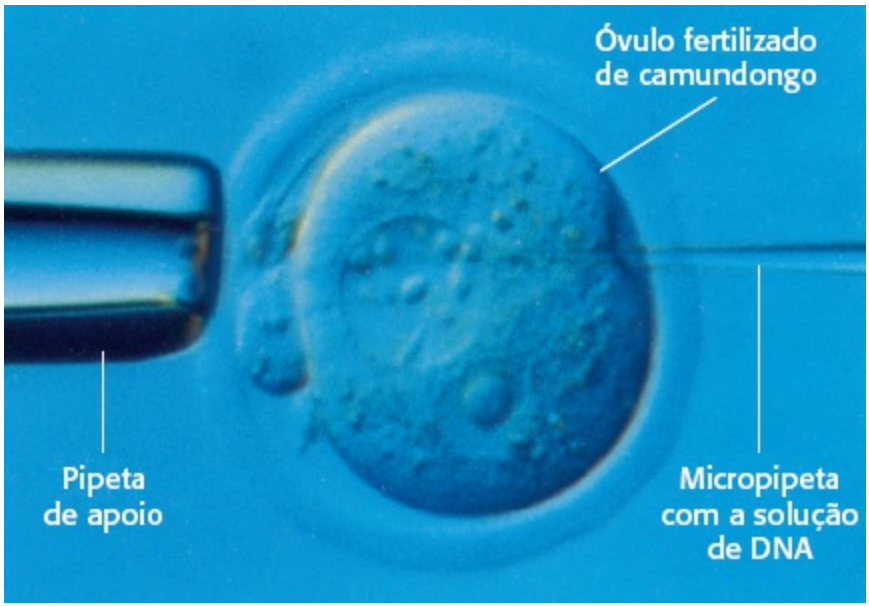


Figura 5.31 Microinjeção de DNA. O DNA clonado no plasmídio está sendo microinjetado no pronúcleo masculino de um óvulo fertilizado de camundongo.

Outros dois vetores virais são usados extensivamente. O *vírus da Vaccinia*, um vírus grande contendo DNA, replica-se no citoplasma de células de mamíferos, onde ele desliga a síntese proteica da célula hospedeira. O *Baculovirus* infecta células de insetos, que podem ser convenientemente cultivadas. As larvas de inseto infectadas com este vírus podem servir como fábricas proteicas eficientes. Os vetores derivados destes vírus de grandes genomas foram manipulados para expressar inserções de DNA de maneira eficiente.

Animais transgênicos portam e expressam genes introduzidos em suas linhagens germinativas

Como mostrado na Figura 5.31, os plasmídios portadores de genes exógenos podem ser injetados no pronúcleo masculino de óvulos fertilizados, os quais são então inseridos no útero da cobaia (camundongo) mãe adotiva. Um subconjunto dos embriões resultantes neste hospedeiro irão então portar o gene exógeno; estes embriões poderão se desenvolver em animais maduros. O *Southern blotting* do DNA da prole pode ser usado para determinar qual descendente porta o gene introduzido. Estes *camundongos transgênicos* são maneiras poderosas de explorar o papel de um gene específico sobre o desenvolvimento, crescimento e comportamento de todo um organismo. Animais transgênicos servem, em geral, como modelos para um processo específico de uma doença, permitindo que pesquisadores testem a eficácia e a segurança de uma terapia recém-desenvolvida.

Voltemos ao nosso exemplo da ELA. Grupos de pesquisa geraram linhagens de camundongos transgênicos que expressam formas da superóxido dismutase humana com as mutações anteriormente identificadas por análises genéticas. Muitas destas linhagens exibem um quadro clínico similar

àquele observado em pacientes com ELA: fraqueza progressiva dos músculos voluntários e paralisia eventual, perda de neurônios motores e rápida progressão ao óbito (Figura 5.32). Desde sua primeira caracterização em 1994, estas linhagens continuam a servir como valiosas fontes de informação para a exploração do mecanismo, e potencial tratamento, da ELA.

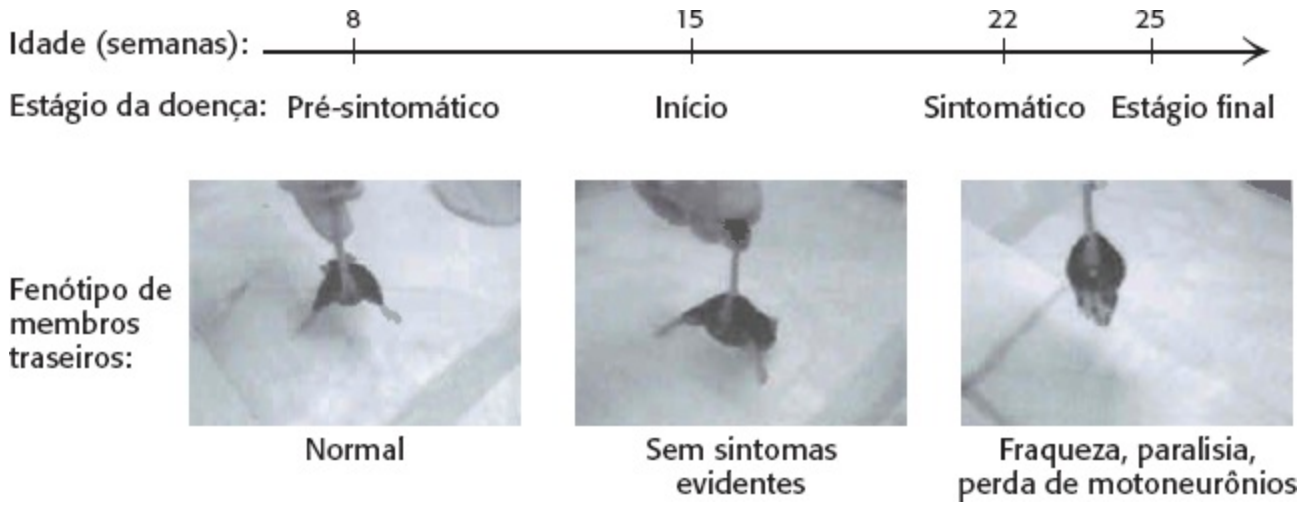


Figura 5.32 Camundongo transgênico. Camundongos expressando a SOD1 humana portadora de uma mutação causadora da ELA exibem um fenótipo semelhante ao da doença humana, incluindo a perda de motoneurônios, fraqueza da musculatura voluntária e paralisia. [Segundo C. S. Lobsinger *et al.*, *PNAS* 104:7319-7326, 2007. Direitos reservados 2007 National Academy of Sciences, E.U.A.]

A interrupção gênica fornece pistas sobre o funcionamento do gene

A função de um gene pode também ser testada inativando-se este gene e observando-se as anormalidades resultantes. Métodos poderosos foram desenvolvidos para se atingir *interrupção gênica* (também chamada de *gene knockout*) em organismos como leveduras e camundongos. Estes métodos baseiam-se no processo de *recombinação homóloga*. Por meio deste processo, regiões com forte similaridade de sequência trocam segmentos de DNA. O DNA exógeno inserido em uma célula pode então interromper qualquer gene que é pelo menos parcialmente homólogo por meio da troca de segmentos (Figura 5.33). Genes específicos podem ser alvos se suas sequências de nucleotídios forem conhecidas.

Por exemplo, a abordagem do *knockout* de um gene foi aplicada aos genes codificantes de proteínas regulatórias (também chamadas de *fatores de transcrição*) que controlam a diferenciação de células musculares. Quando ambas as cópias do gene da proteína regulatória *miogenina* são interrompidos, o animal morre ao nascimento, porque não tem a musculatura esquelética funcional. A inspeção microscópica revela que os tecidos nos quais o músculo normalmente se forma contêm células precursoras que não se diferenciaram completamente (Figura 5.34). O camundongo heterozigoto contendo um gene normal da miogenina e um interrompido parece ser normal, sugerindo que o nível da expressão gênica não é essencial à sua função. Estudos análogos testaram a função de muitos outros genes para a geração de modelos animais de doenças genéticas humanas.

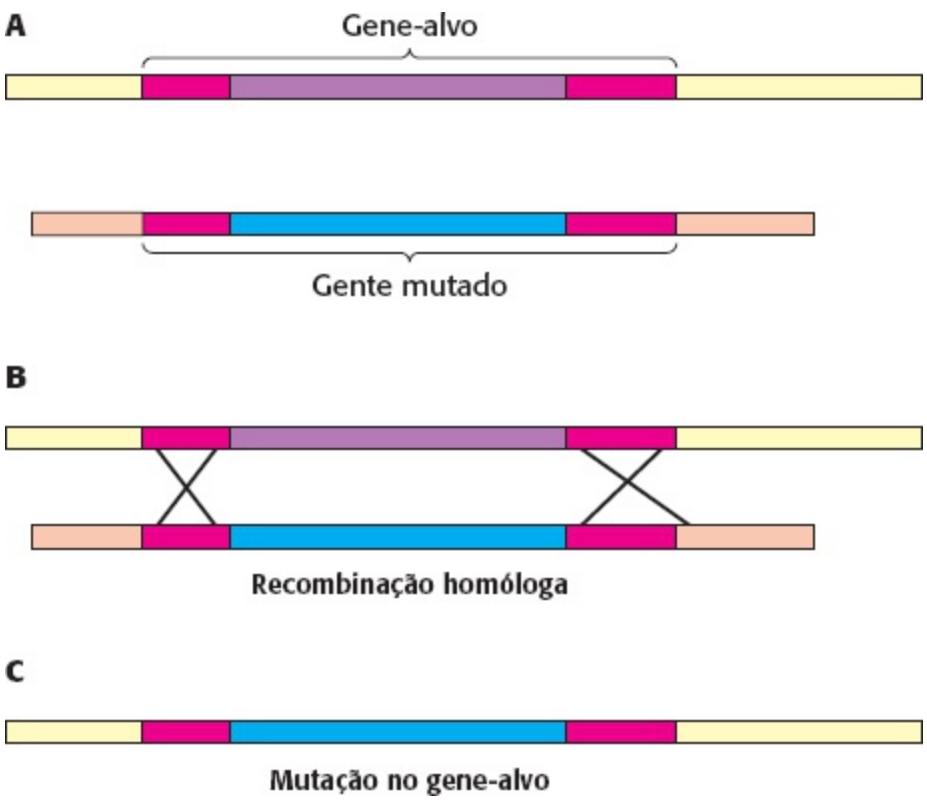


Figura 5.33 Interrupção gênica por recombinação homóloga. A. A versão mutada do gene a ser interrompido é construída, mantendo algumas regiões de homologia com o gene normal (vermelho). Quando o gene mutado exógeno é introduzido na célula-tronco embrionária **B.** a recombinação ocorre nas regiões com homologia e **(C)** o gene normal (alvo) é substituído pelo gene exógeno. A célula é inserida em embriões e o camundongo sem o gene (camundongo *knockout*) é produzido.

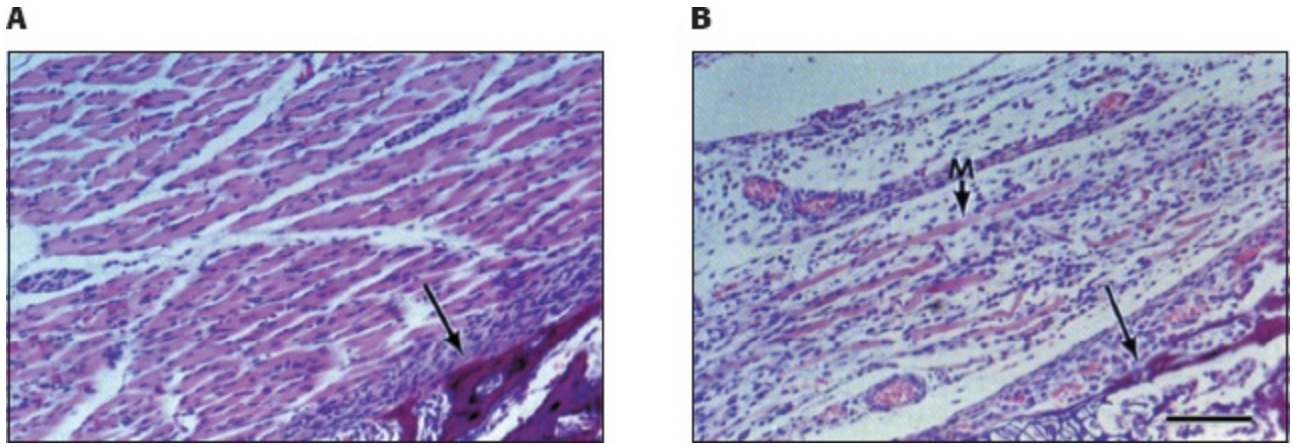


Figura 5.34 Consequências da interrupção gênica. Seções de músculos de camundongos (**A**) normais e (**B**) genes interrompidos, vistos por microscopia óptica. Os músculos não se desenvolvem apropriadamente nos camundongos que têm ambos os genes da miogenina interrompidos. [De P. Hasty, A. Bradley, J. H. Morris, D. G. Edmondson, J. M. Venuti, E. N. Olson, and W. H. Klein, *Nature* 364:501-506, 1993.]

RNA de interferência fornece uma ferramenta adicional para a interrupção da expressão gênica

Uma ferramenta extremamente poderosa para a interferência da expressão gênica foi descoberta casualmente ao longo das pesquisas que exigiam a introdução de RNA em uma célula. A introdução de uma molécula específica de RNA de fita dupla causou a supressão da transcrição dos genes que continham a mesma sequência gênica presente na molécula inserida. Desta maneira, a introdução de uma molécula específica de RNA pode interferir na expressão de um gene específico.

O mecanismo do *RNA* de *interferência* foi bem estabelecido (Figura 5.35). Quando uma molécula de fita dupla de RNA é introduzida em uma célula apropriada, o RNA é clivado em fragmentos de aproximadamente 21 nucleotídios de extensão por uma enzima conhecida como *Dicer*. Cada fragmento, chamado de pequeno RNA de interferência (siRNA, do inglês *small interfering RNA*), consiste em 19 pb de RNA em fita dupla e 2 bases de RNA não pareadas em cada extremidade 5′. O siRNA é incorporado a um conjunto de várias proteínas chamadas de *complexo de silenciamento induzido por RNA* (RISC, do inglês *RNA-induced silencing complex*), que separa as fitas de RNA dúplex e corta uma delas, a chamada *fita passageira*. A outra fita, não clivada, chamada de *fita líder*, permanece incorporada à enzima. O RISC completamente montado corta as moléculas de RNA que contêm os complementos exatos da sequência da fita líder. Assim, os níveis de tais moléculas de mRNA são dramaticamente reduzidos.

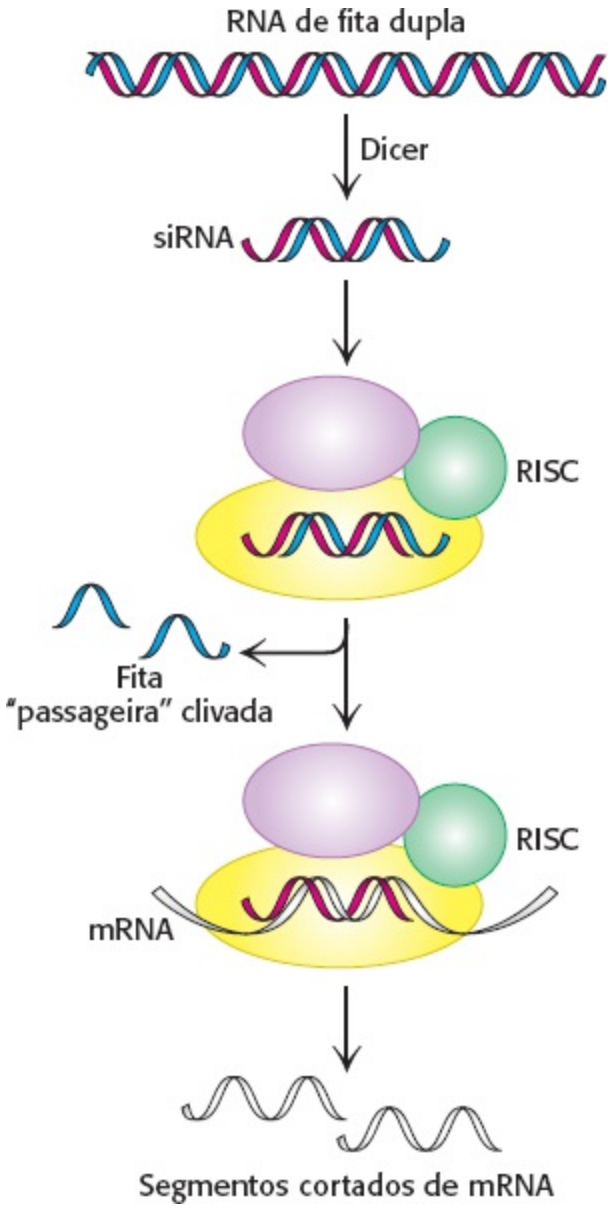


Figura 5.35 Mecanismo de RNA de interferência. Uma molécula de fita dupla de RNA é cortada em fragmentos de 21 pb pela enzima Dicer para produzir siRNA. Estes siRNA são incorporados em complexos de silenciamento induzidos por RNA (RISC), onde os RNA de fita única guiam a clivagem de mRNA que contém sequências complementares.

A maquinaria necessária para a interferência de RNA é encontrado em muitas células. Em alguns organismos, como a *C. elegans*, a interferência de RNA é bem eficiente. De fato, a interferência de

RNA pode ser induzida simplesmente alimentando-se o *C. elegans* com linhagens de *E. coli* que foram manipuladas para produzirem moléculas de RNA de fita dupla apropriadas. Embora não seja tão eficiente nas células de mamíferos, a interferência de RNA surgiu como uma poderosa ferramenta de pesquisa para reduzir a expressão de genes específicos. Além disso, estão sendo realizados testes clínicos iniciais de terapias com base no RNA de interferência.

Plasmídios indutores de tumores podem ser utilizados para introduzir novos genes em células vegetais

A bactéria comum do solo, *Agrobacterium tumefaciens,* infecta e introduz genes exógenos em células vegetais (Figura 5.36). Massa de tecido tumoral chamada de "galha da coroa" cresce no local da infecção. A galha da coroa sintetiza opinas, um grupo de derivados de aminoácidos que são metabolizados pela bactéria infectante. De fato, o metabolismo da célula vegetal é desviado para satisfazer o peculiar apetite da bactéria intrusa. Os *plasmídios indutores de tumor* (plasmídios Ti) que são transportados pela *A. tumefaciens* portam instruções para a mudança ao estado tumoral e para a síntese de opinas. Uma pequena parte do plasmídio Ti se integra ao genoma das células vegetais infectadas; este segmento de 20 kb é chamado de *T-DNA* (DNA transferido; Figura 5.37).

Figura 5.36 Tumores em plantas. A galha da coroa, um tumor vegetal, é causada por uma bactéria (*Agrobacterium tumefaciens*) que porta um plasmídio indutor de tumor (plasmídio Ti). [De M. Escobar *et al., PNAS* 98:13437-13442, 2001. Direitos autorais 2001: National Academy of Sciences, E. U. A.]

Os derivados do plasmídio Ti podem ser usados como vetores para introduzir genes exógenos em células vegetais. Primeiramente, um segmento do DNA exógeno é inserido na região do T-DNA de um plasmídio pequeno por meio do uso de enzimas de restrição e ligases. Este plasmídio sintético é adicionado às colônias de *A. tumefaciens* portadoras de plasmídios Ti naturais. Por recombinação, os plasmídios Ti contendo o gene exógeno são formados. Estes vetores Ti são muito promissores como ferramentas para explorar os genomas de células vegetais e para a modificação de vegetais para aumentar seu valor agrícola e melhorar a colheita. No entanto, eles não são adequados para transformar todos os tipos de plantas. A transferência de plasmídios Ti é efetiva com dicotiledôneas

(vegetais de folhas largas, como as uvas) e alguns tipos de monocotiledôneas, mas não é efetiva nos cereais monocotiledôneos economicamente relevantes.

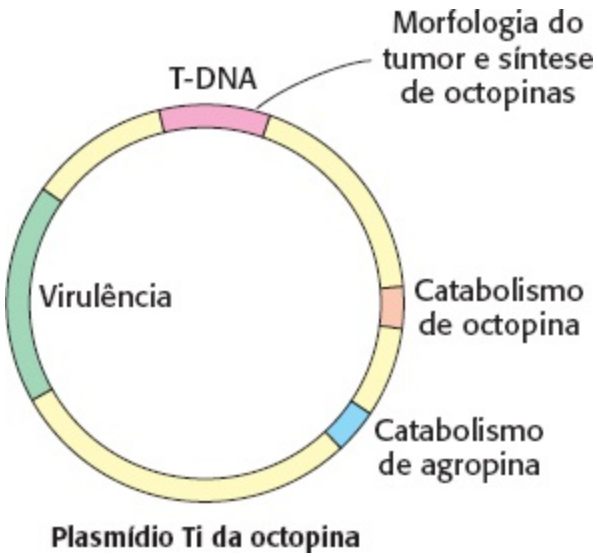


Figura 5.37 Plasmídios Ti. Agrobactérias contendo plasmídios Ti podem introduzir genes exógenos em algumas células vegetais. [De M Chilton. A vetor for introducing new genes into plants. Direitos autorais © 1983 pela Scientific American, Inc. Todos os direitos reservados.]

O DNA exógeno pode ser introduzido em monocotiledôneos, assim como em dicotiledôneos, por meio da aplicação de campos elétricos intensos, em uma técnica chama de *eletroporação* (Figura 5.38). Inicialmente, a parede celular que circunda as células vegetais é removida adicionando-se celulase; este tratamento produz *protoplastos*, células vegetais com as membranas plasmáticas expostas. Os pulsos elétricos são então aplicados a uma suspensão de protoplastos e DNA de plasmídios. Como os elevados campos elétricos tornam a membrana temporariamente permeável a grandes moléculas, moléculas de DNA de plasmídios entram nas células. Permite-se então que a parede celular seja reconstituída, e as células vegetais são viáveis novamente. Células de milho e cenoura foram assim transformadas de maneira estável, utilizando-se o DNA de plasmídios, que inclui genes para a resistência a antibióticos. Além disso, as células transformadas expressam de maneira eficiente o DNA de plasmídios. A eletroporação é também um meio eficiente de se introduzir DNA em células animais e bacterianas.

A maneira mais efetiva de transformar células vegetais é pelo uso de "*pistolas gênicas*" (do inglês, *gene guns*), *biobalística ou biolística*, ou *"transformação mediada por bombardeamento"*. O DNA é posto sobre esferas de tungstênio de 1 mm de diâmetro,[1] e estes microprojéteis são atirados contra as células-alvo com velocidades maiores que 400 m • s^{-1}. Apesar de parecer rústica, esta técnica tem se mostrado a mais efetiva maneira de transformar células vegetais, especialmente espécies como soja, milho, trigo e arroz. A técnica de biobalística promove uma oportunidade para o desenvolvimento de organismos geneticamente modificados (OGM), com características benéficas, como a capacidade de crescer em solos pobres, resistência às variações climáticas naturais, resistência às pragas e enriquecimento nutricional. Estas colheitas podem ser úteis em países em desenvolvimento. O uso de organismos geneticamente modificados é altamente controverso em decorrência dos receios de efeitos colaterais inesperados.

O primeiro OGM que chegou ao mercado foi um tomate caracterizado por seu atraso no processo de amadurecimento, tornando-o ideal para o transporte. A pectina é um polissacarídio que dá ao

tomate sua consistência (firmeza) e é naturalmente destruída pela enzima *poligalacturonase*. À medida que a pectina é destruída, o tomate se torna mais macio, tornando o transporte mais difícil. Um DNA foi introduzido de modo a interferir no gene da poligalacturonase. Menor quantidade da enzima foi produzida, e o tomate se manteve fresco por mais tempo. No entanto, o débil sabor do tomate prejudicou seu sucesso comercial.

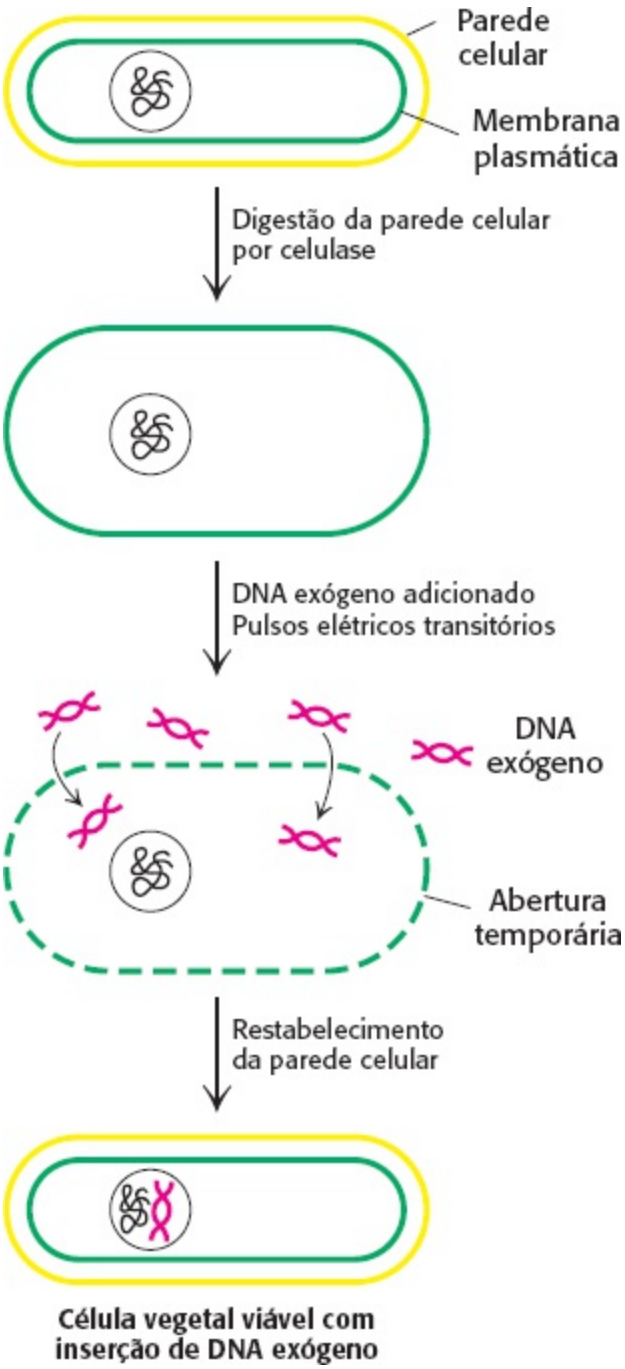


Figura 5.38 Eletroporação. O DNA exógeno pode ser introduzido em células vegetais por meio da eletroporação, a aplicação de campos elétricos intensos para tornar a membrana plasmática temporariamente permeável.

A terapia gênica em humanos é promissora para a medicina

O campo da *terapia gênica* tenta expressar genes específicos no corpo humano de modo que resultados benéficos sejam obtidos. O genealvo pode já ser expresso ou ser especialmente introduzido. Alternativamente, a terapia gênica pode tentar modificar genes com variações em sua sequência que tenham consequências deletérias. Ainda precisa ser feita muita pesquisa antes que a

terapia gênica se torne prática; no entanto, já houve um considerável progresso. Por exemplo, algumas pessoas carecem dos genes funcionais para a *desaminase da adenosina* e sucumbem a infecções quando expostas ao ambiente normal, uma patologia chamada de imunodeficiência combinada grave (SCID, do inglês *severe combined immunodeficiency*). Os genes funcionais desta enzima foram introduzidos utilizando-se vetores de terapia gênica com base em retrovírus. Embora tais vetores tenham produzido a enzima funcional e reduzido os sintomas clínicos, continua havendo desafios, como o aumento da duração dos efeitos e a eliminação de efeitos colaterais indesejados. Futuras pesquisas prometem transformar a terapia gênica em uma ferramenta importante para a medicina clínica.

Resumo

5.1 A exploração dos genes baseia-se em ferramentas específicas

A revolução do DNA recombinante na biologia baseia-se no repertório de enzimas que agem sobre os ácidos nucleicos. As enzimas de restrição são um grupo-chave entre elas. As endonucleases reconhecem sequências de bases específicas no DNA de fita dupla e corta ambas as fitas da molécula, formando fragmentos específicos de DNA. Estes fragmentos de restrição podem ser separados e visualizados por meio de gel de eletroforese. O padrão destes fragmentos no gel é uma impressão digital de uma molécula de DNA. Um fragmento de DNA contendo uma sequência específica pode ser identificado por hibridização com uma sonda de DNA de fita única marcada (*Southern blot*ting).

Técnicas de sequenciamento rápido foram desenvolvidas para análise adicional de moléculas de DNA. O DNA pode ser sequenciado por meio da terminação controlada da replicação. Os fragmentos produzidos são separados por eletroforese em gel e visualizados por autorradiografia de uma marcação da extremidade 5′ feita com ^{32}P ou por marcadores fluorescentes.

Sondas de DNA para reações de hibridização, assim como novos genes, podem ser sintetizados por métodos automatizados em fase sólida. A técnica adiciona *desoxirribonucleosídios 3'-fosforamidita* umas às outras para formar uma cadeia em crescimento, ligada a um suporte insolúvel. Cadeias de DNA de centenas de nucleotídios de extensão podem ser prontamente sintetizadas. A reação em cadeia da polimerase torna possível a grande amplificação de fragmentos de DNA específicos *in vitro*. A região amplificada é determinada pela colocação de um par de iniciadores que são adicionados ao DNA-alvo, em conjunto com uma DNA polimerase termoestável e os trifosfatos de desoxirribonucleotídios. A peculiar sensibilidade da PCR a torna uma técnica de escolha para a identificação de patógenos e marcadores de câncer, em genotipagem e na leitura de DNA em fósseis que têm milhares de anos de idade.

5.2 A tecnologia do DNA recombinante revolucionou todos os aspectos da biologia

Novos genes podem ser construídos em laboratório, introduzidos em células hospedeiras e expressos. Novas moléculas de DNA são feitas por meio da união de fragmentos que têm extremidades complementares coesivas produzidas pela ação de uma enzima de restrição. A DNA ligase sela rupturas das cadeias de DNA. Os vetores para a propagação do DNA incluem

plasmídios, fagos λ e cromossomos artificiais de bactérias e leveduras. Genes específicos podem ser clonados a partir de uma biblioteca genômica com o uso de sondas de DNA ou RNA. O DNA exógeno pode ser expresso após a inserção em células procarióticas e eucarióticas por meio do vetor apropriado. Mutações específicas podem ser geradas *in vitro* para produção de novas proteínas. Uma proteína mutante com uma substituição de um único aminoácido pode ser construída por meio da indução da replicação do DNA com um oligonucleotídio codificando o novo aminoácido. Os plasmídios podem ser construídos para permitirem a inserção de um cassete de DNA contendo qualquer mutação desejada. As técnicas para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos são altamente sinergistas. Os pesquisadores agora manipulam com facilidade os genes e as proteínas.

5.3 Genomas completos foram sequenciados e analisados

As sequências de muitos genomas importantes são agora completamente conhecidas. Mais de 100 genomas de bactérias e arqueias foram sequenciados, incluindo aqueles de organismos-modelo e patógenos importantes. A sequência do genoma humano foi terminada com a cobertura quase completa e alta precisão. Apenas algo entre 20.000 e 25.000 genes codificantes de proteínas parecem estar presentes no genoma humano, um número significativamente menor do que as estimativas iniciais. A genômica comparativa tornou-se uma poderosa ferramenta para a análise de genomas individuais e para explorar a evolução. Padrões de expressão gênica comuns a todo genoma podem ser examinados por meio de microarranjos de DNA.

5.4 Genes eucarióticos podem ser quantificados e manipulados com considerável precisão

Mudanças na expressão gênica podem ser prontamente determinadas por técnicas como PCR quantitativa, hibridização e microarranjos. A produção de camundongos transgênicos portando mutações que sabidamente causam ELA em humanos foi uma fonte considerável de percepções sobre os mecanismos da doença e seus possíveis tratamentos. As funções de genes específicos podem ser investigadas por perturbação. Um método de interferir na expressão de um gene específico é a interferência de RNA, que depende da introdução de uma molécula de RNA de fita dupla específica em células eucarióticas. Novos DNA podem ser introduzidos em células vegetais por meio da bactéria de solo *Agrobacterium tumefaciens*, que porta plasmídios Ti. O DNA pode também ser introduzido pela aplicação de campos elétricos intensos, que os torna temporariamente permeáveis a moléculas bem grandes, ou por bombardeamento com micropartículas recobertas com DNA. A terapia gênica é muito promissora para a medicina clínica, mas muitos desafios permanecem.

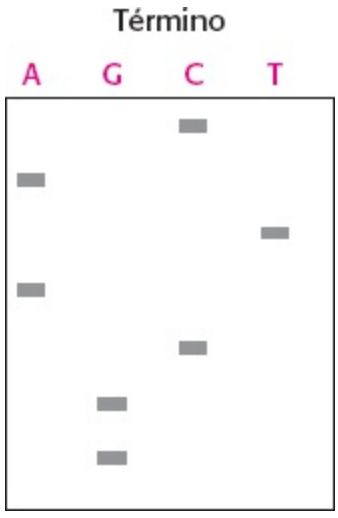
Palavras-chave

biblioteca de cDNA (p. 156)
biblioteca genômica (p. 154)
camundongo transgênico (p. 166)
complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (p. 168)
controle do término da replicação (método didesoxi de Sanger) (p. 145)

cromossomo artificial bacteriano (p. 153)
cromossomo artificial de levedura (p. 153)
DNA complementar (cDNA) (p. 156)
DNA ligase (p. 150)
elemento genético móvel (p. 161)
elementos intercalados curtos (SINES) (p. 161)
elementos intercalados longos (LINES) (p. 161)
enzima de restrição (p. 143)
extremidades coesivas (p. 150)
fago lambda (l) (p. 152)
gene gun (biobalística) (transformação mediada por bombardeamento) (p. 169)
interrupção gênica (gene *knockout*) (p. 166)
microarranjo de DNA (chip de DNA) (p. 164)
mutagênese de cassete (p. 158)
mutagênese sítio-dirigida (p. 158)
Northern blotting (p. 144)
palíndromo (p. 143)
PCR quantitativa (qPCR) (p. 163)
plasmídio (p. 150)
plasmídio indutor de tumor (plasmídio Ti) (p. 168)
polimorfismo (p. 149)
pseudogene (p. 161)
reação em cadeia da polimerase (p. 147)
RNA de interferência (p. 167)
sonda de DNA (p. 144)
Southern blotting (p. 144)
transcriptase reversa (p. 156)
transcriptoma (p. 164)
vetor (p. 150)
vetor de expressão (p. 152)

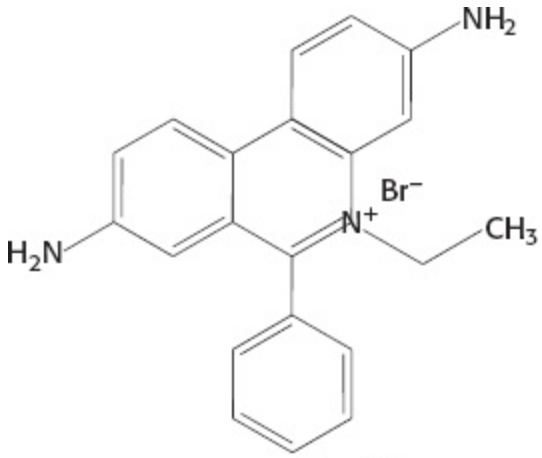
Questões

1. *Lendo sequências*. Uma autorradiografia de um gel de sequenciamento que contém quatro colunas de fragmentos de DNA é exibida na ilustração anexa. (a) Qual a sequência do fragmento de DNA? (b) Suponha que o método didesoxi de Sanger mostre que a sequência da fita molde é 5′-TGCAATGGC-3′. Faça o rascunho do padrão do gel que levaria a esta conclusão.



2. *O molde correto.* A ovoalbumina é a principal proteína da clara do ovo. A ovoalbumina da galinha contém oito éxons separados por sete íntrons. O cDNA da ovoalbumina ou o DNA genômico da ovoalbumina deveriam ser usados para formar a proteína na *E. coli*? Por quê?

3. *Manipule com cautela.* O brometo de etídio é em geral usado para corar moléculas de DNA após a separação por eletroforese em gel. A estrutura química do brometo de etídio é mostrada aqui. Com base nesta estrutura sugira como este corante se liga ao DNA.



Brometo de etídio

4. *Frequência de clivagem.* A enzima de restrição *Alu*I corta na sequência 5′-AGCT-3′ e a *Not*I corta na sequência 5′-GCGGCCGC-3′. Qual seria a distância média entre os locais de corte para cada enzima na digestão do DNA de fita dupla? Assuma que o DNA contém proporções iguais de A, G, C e T.

5. *Os cortes corretos.* Suponha que uma biblioteca genômica humana é preparada por meio de exaustivas digestões do DNA humano com a enzima de restrição *Eco*RI. Fragmentos em torno de 4 kb seriam gerados. Este procedimento é adequado para a clonagem de genes longos? Por que sim ou por que não?

6. *Uma clivagem reveladora.* A anemia falciforme é resultante de uma mutação no gene da cadeia β da hemoglobina humana. A mudança de GAG para GTG no mutante elimina um local de corte da enzima de restrição *Mst*II, que reconhece a sequência-alvo CCTGAGG. Estas descobertas foram a base para o teste diagnóstico para o gene da anemia falciforme. Proponha um procedimento rápido para distinguir o gene normal do mutante. Um resultado positivo provaria que o mutante contém GTG no lugar de GAG?

7. *Extremidades coesivas.* As enzimas de restrição *Kpn*I e *Acc65*I reconhecem e cortam a mesma sequência de 6 pb. No entanto, a extremidade coesiva formada pela clivagem da *Kpn*I não pode ser diretamente ligada à extremidade coesiva formada pela clivagem da *Acc65*I. Explique o motivo.

8. *Muitas melodias de um cassete.* Suponha que você isolou uma enzima que digere a polpa do papel e obteve seu cDNA. O objetivo é produzir um mutante que seja efetivo em alta temperatura. Você construiu um par de sítios de restrição únicos no cDNA flanqueando uma região codificante de 30 pb. Proponha uma técnica rápida para gerar muitas mutações diferentes nesta região.

9. *Uma benção e uma maldição.* O poder da PCR também pode criar problemas. Suponha que alguém diga que isolou o DNA de um dinossauro usando a PCR. Quais questões você deve perguntar para saber se o DNA é de fato de um dinossauro?

10. *Rico ou pobre?* Sequências de DNA que são altamente enriquecidas com pares de bases G–C tipicamente têm altos pontos de fusão. Além disso, uma vez separadas, as fitas únicas contendo estas regiões podem formar estruturas secundárias rígidas. Como a presença de regiões ricas em G–C em um molde de DNA podem afetar a amplificação por PCR?

11. *Questões de precisão.* O rigor na amplificação da PCR pode ser controlado alterando-se a temperatura na qual os iniciadores e o DNA se hibridizam. Como a alteração da temperatura afetaria a amplificação? Suponha que você tenha um gene *A* de levedura em particular e você quer ver se ele tem um correlato em humanos. Como o controle do rigor da hibridização poderia te ajudar?

12. *Terra desconhecida.* A PCR é tipicamente usada para amplificar o DNA que se localiza entre duas sequências conhecidas. Suponha que você queira explorar o DNA de ambos os lados de uma sequência conhecida. Desenvolva uma variação do protocolo usual da PCR que permitirá que você amplifique um trecho genômico completamente novo.

13. *Uma escada misteriosa.* Um padrão de gel exibindo produtos de uma PCR exibe quatro bandas fortes. Os quatro pedaços de DNA têm comprimentos que possuem aproximadamente as proporções 1:2:3:4. A banda maior (mais longa) é cortada do gel e a PCR é repetida com os mesmos iniciadores. Novamente, uma escada com quatro bandas é evidente no gel. O que este resultado revela sobre a estrutura da proteína codificada?

14. *Caminhada cromossômica.* Proponha um método para isolar um fragmento de DNA adjacente no genoma a um fragmento de DNA previamente isolado. Assuma que você tem acesso à biblioteca completa de fragmentos de DNA em um vetor BAC, mas a sequência do genoma sob investigação ainda não foi completamente determinada.

15. *Projeto de sondas.* Qual das seguintes sequências de aminoácidos forneceria a melhor sonda de oligonucleotídios?

Ala-Met-Ser-Leu-Pro-Trp
Gly-Trp-Asp-Met-His-Lys
Cis-Val-Trp-Asn-Lys-Ile
Arg-Ser-Met-Leu-Gln-Asn

16. *Melhor amigo do homem.* Por que a análise genômica do cão pode ser particularmente útil para investigar genes responsáveis pelo tamanho corporal e outras características físicas?

17. *De camundongos e homens.* Você identificou um gene que está localizado no cromossomo 20 e quer identificar sua localização no genoma do camundongo. Em qual cromossomo seria mais

provável encontrar o correlato deste gene no camundongo?

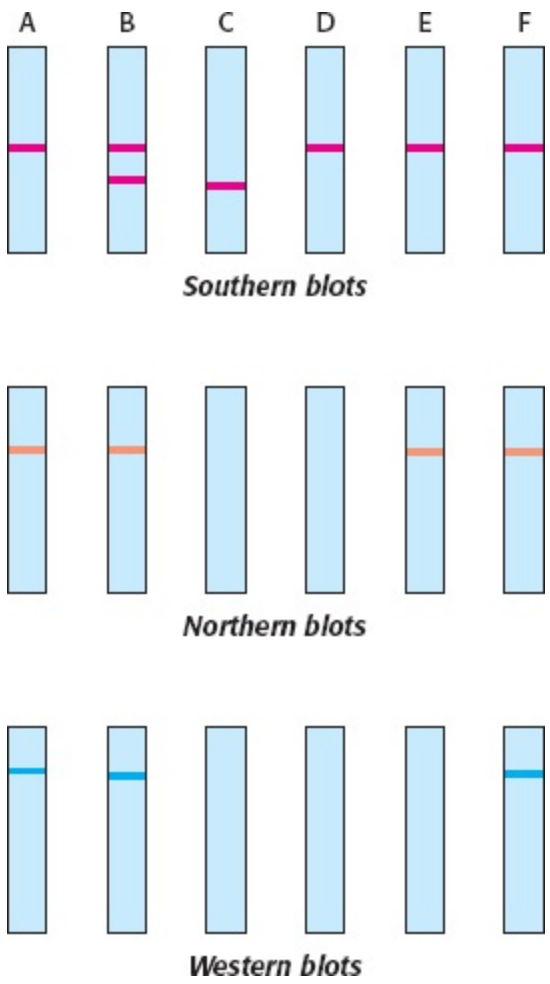
Questões | Integração de capítulos

18. *Projetando iniciadores I.* Um experimento de PCR depende, em geral, da projeção ds iniciadores corretos. Em particular, a *Tm* de cada iniciador deveria ser aproximadamente a mesma. Qual é a base desta exigência?

19. *Projetando iniciadores II.* Você deseja amplificar uma sequência de DNA de um plasmídio-molde por PCR usando os seguintes iniciadores: 5′-GGATCGATGCTCGCGA-3′ e 5′-AGGATCGGGTCGCGAG-3′. Apesar de repetidas tentativas, você não observa um produto de PCR com o tamanho esperado após a eletroforese em gel de agarose. Ao contrário, você observa uma borrão claro no gel com um tamanho aproximado de 25 a 30 pares de base. Explique os resultados.

Questão | Integração de capítulos e Interpretação de dados

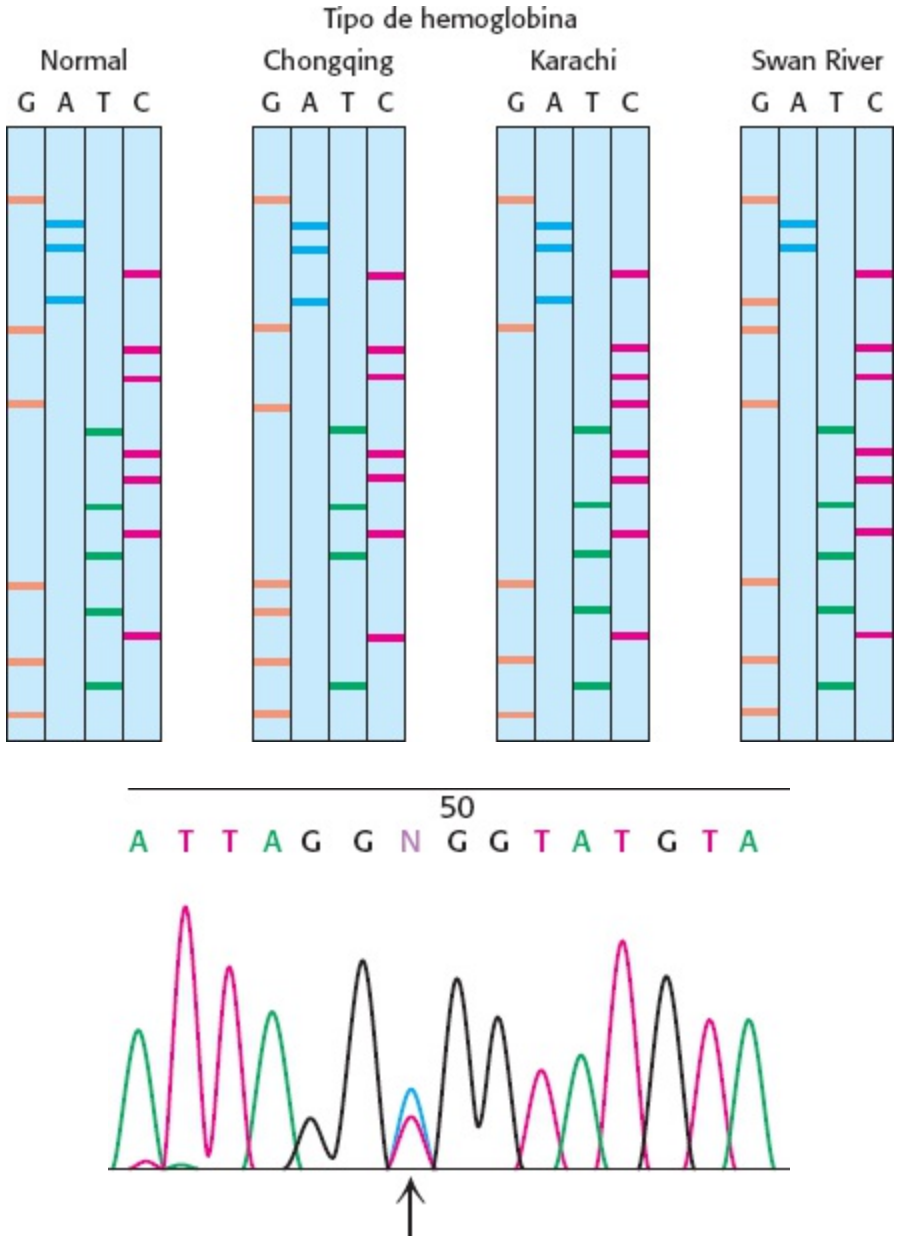
20. *Qualquer direção, menos leste.* Uma série de pessoas tem dificuldade de eliminar certas substâncias de suas correntes sanguíneas. O problema parece estar ligado com o gene X, que codifica a enzima Y. Seis pessoas foram testadas com o uso de várias técnicas de biologia molecular. O indivíduo A é o controle normal, o indivíduo B é assintomático, mas alguns de seus filhos têm o problema metabólico, e os indivíduos de C a F exibem o traço. Amostras de tecidos de cada um foram obtidas. Análises por Southern foram executadas no DNA com a enzima de restrição *Hind*III. A análise por *Northern* do mRNA também foi feita. Em ambas as análises, a sonda usada nos géis foi o cDNA de *X* marcado. Finalmente, um *Western blot* com anticorpo marcado para a enzima foi utilizado para avaliar a presença da proteína Y. Os resultados são exibidos aqui. Por que o indivíduo B não apresenta os sintomas? Sugira os possíveis defeitos nas outras pessoas.



Questões | Interpretação de dados

21. *Diagnóstico por DNA*. Representações dos géis de sequenciamento para variantes da cadeia α da hemoglobina humana são mostradas aqui. Qual é a natureza da mudança de aminoácido em cada uma das variantes? A primeira trinca codifica a valina.

22. *Dois picos*. Ao longo do estudo de um gene e suas possíveis mutações em humanos, você obteve amostras de DNA genômico de um grupo de pessoas e amplificou uma região de interesse deste gene. Para uma de suas amostras, você obteve o cromatograma de sequenciamento mostrado aqui. Dê a explicação para o aparecimento destes dados na posição 49 (indicado pela seta).


Tipo de hemoglobina
Normal
Chongqing
Karachi
Swan River
G A T C
G A T C
G A T C
G A T C
50
A T T A G G N G G T A T G T A

[1] N.T.: O tamanho das esferas de tungstênio ou ouro pode variar, mas, em geral, giram em torno de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro.

Estudo da Evolução e da Bioinformática

6

```
GLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEVLIRLFKGHPETLEKFDKFKHLKSEDEMKASEDLKKHGATVLTALGGIL-
GLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEVLIRLFKGHPETLEKFDKFKHLKSEDEMKASEDLKKHGATVLTALGGIL-

KKKGHHEAEIKPLAQSHATKHKIPVKYLEFISECIIQVLHSKHPGDFGADAQGAMNKALELFRKDMASNYKELGFQG
KKKGHHEAEIKPLAQSHATKHKIPVKYLEFISECIIQVLQSKHPGDFGADAQGAMNKALELFRKDMASNYKELGFQG
```

As relações evolutivas são manifestas em sequências de proteínas. O estreito parentesco entre os seres humanos e os chimpanzés, sugerido pelo mútuo interesse demonstrado por Jane Goodall e um chimpanzé na fotografia ao lado, é revelado nas sequências de aminoácidos da mioglobina. A sequência humana (em vermelho) difere da sequência do chimpanzé (azul) em apenas um aminoácido em uma cadeia proteica de 153 resíduos. [Fotografia de Kennan Ward/Corbis.]

SUMÁRIO

6.1 Os homólogos são descendentes de um ancestral comum

6.2 A análise estatística do alinhamento de sequências pode detectar a homologia

6.3 O exame da estrutura tridimensional amplia nossa compreensão das relações evolutivas

6.4 Árvores evolutivas podem ser construídas com base nas informações das sequências

6.5 As técnicas modernas disponíveis possibilitam a exploração experimental da evolução

À semelhança dos membros de uma família humana, os membros de famílias moleculares frequentemente apresentam características em comum. Essa semelhança familiar é mais facilmente detectada quando é comparada à estrutura tridimensional, isto é, o aspecto de uma

molécula mais estreitamente ligado à sua função. Considere como exemplo a ribonuclease de vacas, que foi introduzida em nossa discussão do enovelamento das proteínas (Seção 2.6). A comparação das estruturas revela que a estrutura tridimensional dessa proteína e a de uma ribonuclease humana são muito semelhantes (Figura 6.1). Embora o grau de superposição entre essas duas estruturas não seja inesperado, tendo em vista as suas funções biológicas quase idênticas, as similaridades reveladas por outras comparações desse tipo são algumas vezes surpreendentes. Por exemplo, a angiogenina, uma proteína que estimula o crescimento de novos vasos sanguíneos, também exibe uma semelhança estrutural com a ribonuclease – tão grande que tanto a angiogenina quanto a ribonuclease são claramente membros da mesma família de proteínas (Figura 6.2). A angiogenina e a ribonuclease devem ter tido um ancestral comum em algum estágio inicial da evolução.

As estruturas tridimensionais só foram determinadas para uma pequena proporção do número total de proteínas. Em contrapartida, as sequências gênicas e as sequências dos aminoácidos correspondentes estão disponíveis para um grande número de proteínas, em grande parte devido ao enorme poder das técnicas de clonagem e sequenciamento do DNA, incluindo aplicações para o sequenciamento de todo o genoma. As relações evolutivas também se manifestam nas sequências de aminoácidos. Por exemplo, 35% dos aminoácidos em posições correspondentes são idênticos nas sequências da ribonuclease bovina e da angiogenina. Esse nível é alto o suficiente para garantir uma relação evolutiva? Caso não seja, que nível é necessário? Neste capítulo, iremos examinar os métodos que são empregados para comparar as sequências de aminoácidos e deduzir essas relações evolutivas.

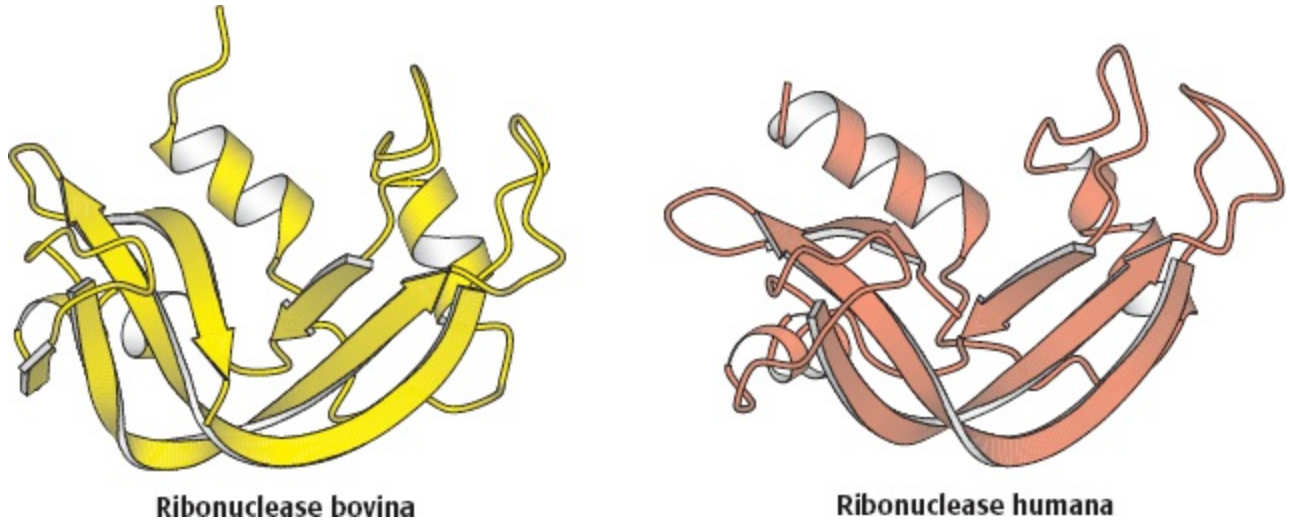


Figura 6.1 Estruturas de ribonucleases de vacas e de seres humanos. A semelhança estrutural frequentemente acompanha a semelhança funcional. [Desenhada a partir de 8RAT.pdb. e 2RNF.pdb.]

Os métodos de comparação de sequências tornaram-se poderosas ferramentas na bioquímica moderna. Os bancos de dados de sequências podem ser sondados à procura de correspondências com uma sequência recém-elucidada para identificar moléculas correlatas. Essa informação frequentemente pode constituir uma fonte de esclarecimentos consideráveis sobre a função e o mecanismo da molécula recém-sequenciada. Quando as estruturas tridimensionais estão disponíveis, elas podem ser comparadas para confirmar as relações sugeridas pela comparação de sequências e revelar outras que não são prontamente detectadas no nível da sequência apenas.

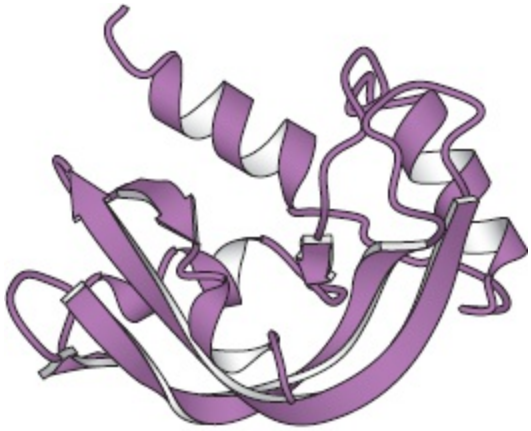


Figura 6.2 Estrutura da angiogenina. A proteína angiogenina, identificada com base na sua capacidade de estimular o crescimento dos vasos sanguíneos, exibe uma estrutura tridimensional altamente semelhante à da ribonuclease. [Desenhada a partir de 2ANG.pdb.]

Ao examinar as pistas presentes nas sequências modernas das proteínas, o bioquímico pode tornar-se um arqueólogo molecular capaz de aprender sobre eventos ocorridos no passado evolutivo. As comparações de sequências frequentemente podem revelar vias de descendência evolutiva e datas estimadas de marcos evolutivos específicos. Essa informação pode ser utilizada para construir arvores evolutivas que seguem a evolução de uma determinada proteína ou ácido nucleico em muitos casos, desde as *Archaea* e *Bacteria* até as *Eukarya*, incluindo os seres humanos. A evolução molecular também pode ser estudada experimentalmente. Em alguns casos, o DNA de fósseis podem ser amplificados pelo método de PCR e sequenciado, proporcionando uma visão direta do passado. Além disso, os pesquisadores podem observar a evolução molecular ocorrendo no laboratório por meio de experimentos com base na replicação de ácidos nucleicos. Os resultados desses estudos estão revelando mais detalhes sobre como ocorre a evolução.

6.1 Os homólogos são descendentes de um ancestral comum

A exploração da evolução bioquímica consiste, em grande parte, na tentativa de determinar como as proteínas, outras moléculas e vias bioquímicas foram transformadas com o passar do tempo. A relação mais fundamental entre duas entidades é a *homologia*. Duas moléculas são consideradas homólogas se elas se originam de um ancestral comum. As moléculas homólogas, ou *homólogos,* podem ser divididas em duas classes (Figura 6.3). Os *parálogos* são homólogos que estão presentes dentro de uma espécie; frequentemente diferem nas suas funções bioquímicas detalhadas. Os *ortólogos* são homólogos que estão presentes em diferentes espécies e que apresentam funções muito semelhantes ou idênticas. A compreensão da homologia entre as moléculas pode revelar a história evolutiva das moléculas, bem como informações acerca de suas funções. Se uma proteína recém-sequenciada for homóloga a uma proteína já caracterizada, temos uma forte indicação da função bioquímica da nova proteína.

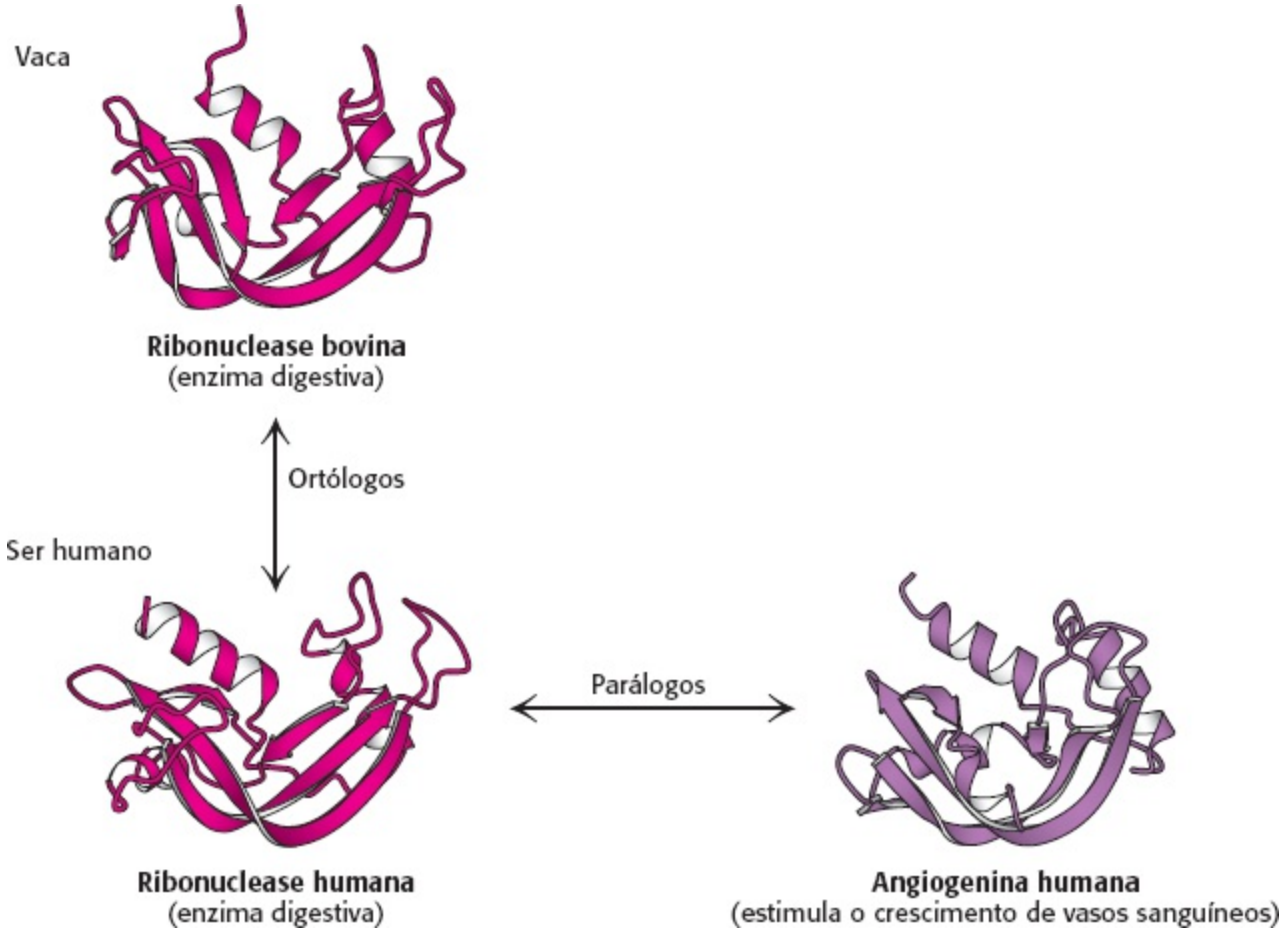


Figura 6.3 Duas classes de homólogos. Os homólogos que desempenham funções idênticas ou muito semelhantes em diferentes espécies são denominados ortólogos, enquanto os homólogos que desempenham funções diferentes dentro de uma mesma espécie são denominados parálogos.

Como podemos saber se duas proteínas humanas são parálogas ou se uma proteína de levedura é o ortólogo de uma proteína humana? Conforme será discutido na Seção 6.2, *a homologia é frequentemente detectável por uma semelhança significativa na sequência de nucleotídios ou de aminoácidos e quase sempre se manifesta na estrutura tridimensional.*

6.2 A análise estatística do alinhamento de sequências pode detectar a homologia

Uma grande semelhança de sequência entre duas moléculas significa que elas provavelmente têm a mesma origem evolutiva e, portanto, estruturas tridimensionais, funções e mecanismos semelhantes. As sequências tanto de ácidos nucleicos quanto de proteínas podem ser comparadas para a detecção da homologia. Entretanto, existe a possibilidade de que o ponto de concordância observado entre duas sequências determinadas seja apenas produto do acaso. Como os ácidos nucleicos são compostos de menos unidades de construção do que as proteínas (4 bases *versus* 20 aminoácidos), a probabilidade de uma concordância aleatória entre duas sequências de DNA e de RNA é significativamente maior para sequências de proteínas. Por esse motivo, a detecção de homologia entre sequências de proteínas é tipicamente muito mais efetiva.

Para ilustrar os métodos de comparação de sequências, consideraremos uma classe de proteínas denominadas *globinas*. A mioglobina é uma proteína que se liga ao oxigênio no músculo, enquanto a

hemoglobina é a proteína transportadora de oxigênio no sangue (Capítulo 7). Ambas as proteínas abrigam um grupo heme, uma molécula orgânica contendo ferro que se liga ao oxigênio. Cada molécula de hemoglobina humana é composta de quatro cadeias polipeptídicas contendo heme: duas cadeias α idênticas e duas cadeias β idênticas. Aqui, consideraremos apenas a cadeia α. Para examinar a semelhança entre a sequência de aminoácidos da cadeia α humana e da mioglobina humana (Figura 6.4), aplicaremos um método, designado como *alinhamento de sequência*, em que duas sequências são sistematicamente alinhadas uma em relação a outra para identificar regiões de superposição significativa.

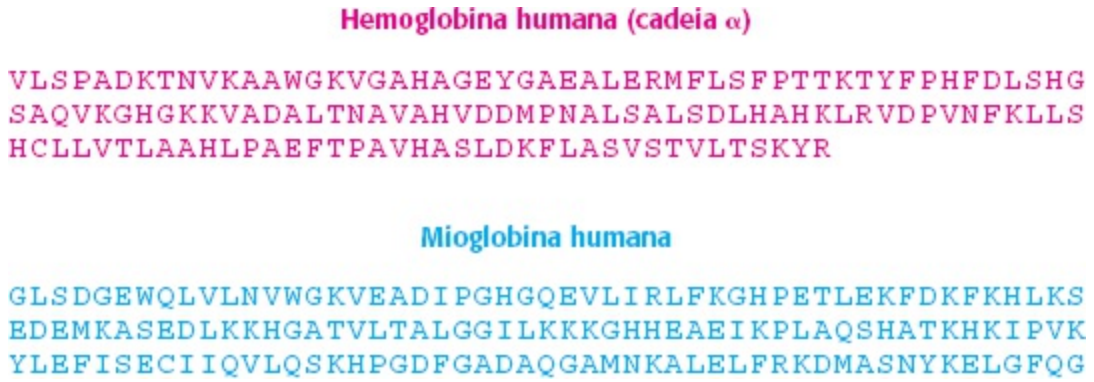


Figura 6.4 Sequências de aminoácidos da hemoglobina (cadeia α) e mioglobina humanas. A hemoglobina α é composta de 141 aminoácidos, enquanto a mioglobina contém 153 aminoácidos. (São utilizadas abreviaturas de uma letra para designar os aminoácidos; ver Tabela 2.2.)

Como podemos saber como alinhar as duas sequências? Durante o processo de evolução, as sequências de duas proteínas que têm um ancestral em comum terão divergido de diversas maneiras. Podem ter ocorrido inserções ou deleções nas extremidades das proteínas ou dentro dos próprios domínios funcionais. Aminoácidos individuais podem ter sido mutados para outros resíduos com grau variável de similaridade. Para compreender como os métodos de alinhamento de sequência levam em conta essas variações potenciais das sequência, consideraremos inicialmente a abordagem mais simples, em que deslizamos uma sequência sobre a outra, com um aminoácido de cada vez, e contamos o número de resíduo correspondente ou *identidade de sequência* (Figura 6.5). Para a hemoglobina α e a mioglobina, o melhor alinhamento revela 23 identidades de sequência, distribuídas pelas partes centrais das sequências.

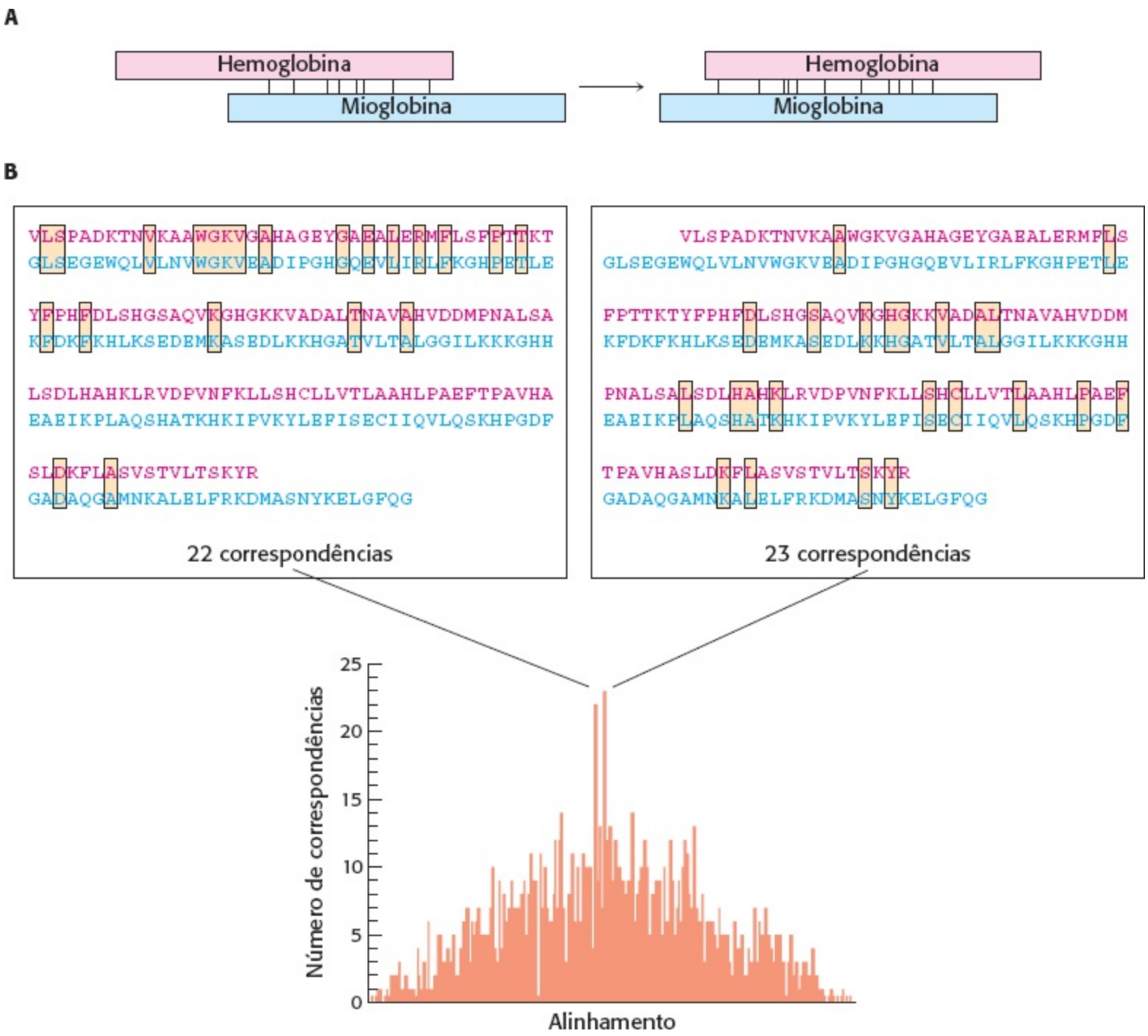


Figura 6.5 Comparação das sequências de aminoácidos da hemoglobina α e da mioglobina. A. A comparação é feita deslizando as sequências das duas proteínas uma sobre a outra, um aminoácido de cada vez, contando o número de identidades de aminoácidos entre as proteínas. **B.** Os dois alinhamentos com o maior número de correspondências são mostrados acima do gráfico, que apresenta as correspondências em função do alinhamento.

Entretanto, um exame cuidadoso de todos os alinhamentos possíveis e seus escores sugere que, com esse método, houve perda de informações importantes sobre a relação entre a mioglobina e a hemoglobina α. Em particular, constatamos que a existência de outro alinhamento, exibindo 22 identidades, é quase tão satisfatório. Esse alinhamento tem um deslocamento de seis resíduos em relação ao alinhamento precedente e fornece identidades que estão concentradas na extremidade aminoterminal das sequências. Com a introdução de um espaço (*gap)* em uma das sequências, as identidades encontradas em *ambos* os alinhamentos estarão representadas (Figura 6.6). A inserção de espaços permite que o método de alinhamento compense as inserções ou deleções de nucleotídios que pode ter ocorrido no gene de uma molécula, mas não na outra, durante o processo de evolução.

O uso de espaços aumenta substancialmente a complexidade do alinhamento de sequências, visto que, em cada sequência, é preciso considerar um vasto número de espaços possíveis, que variam tanto na sua posição quanto no seu comprimento. Além disso, a introdução de um número excessivo de espaços pode produzir um número artificialmente elevado de identidades. Entretanto, foram desenvolvidos métodos para a inserção de espaços no alinhamento automático de sequências. Esses métodos utilizam sistemas de pontuação para comparar diferentes alinhamentos, incluindo penalidades para hiatos a fim de evitar a inserção de um número excessivo deles. Fornecemos aqui um exemplo desse sistema de pontuação: cada identidade entre sequências alinhadas é contada como + 10 pontos, enquanto cada hiato introduzido, independentemente de seu tamanho, tem 25 pontos. Para o alinhamento mostrado na Figura 6.6, existem 38 identidades (38 × 10 = 380) e 1 hiato (1 × [– 25] = – 25), produzindo uma pontuação de (380 + [– 25] = 355). No total, existem 38 aminoácidos correspondentes em um comprimento médio de 147 resíduos; por conseguinte, as sequências são 25,9% idênticas. Em seguida, precisamos determinar o significado dessa pontuação em relação à identidade.

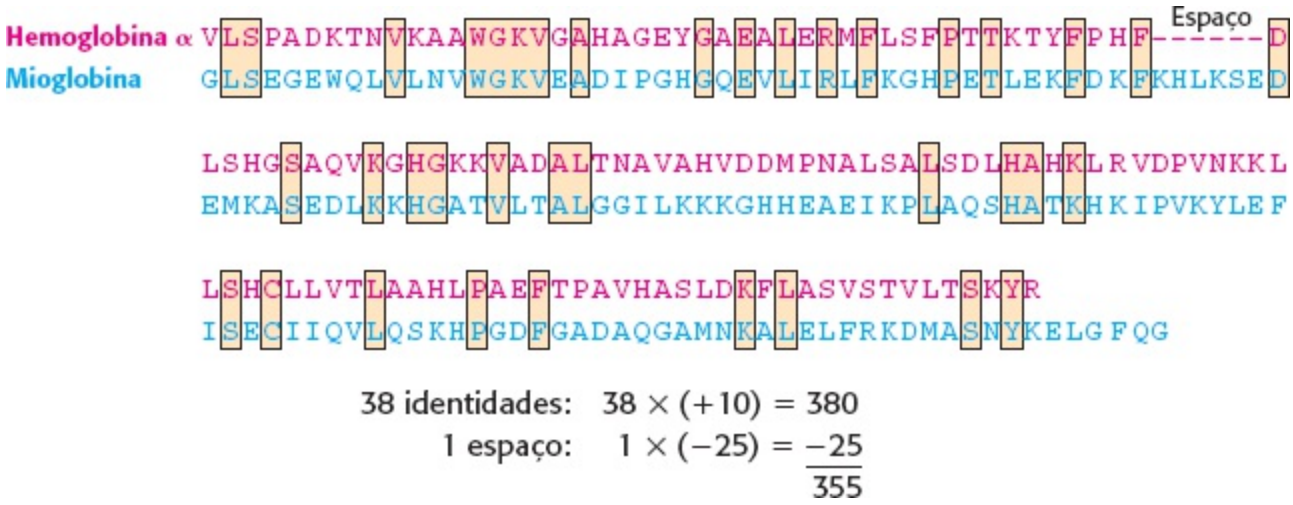


Figura 6.6 Alinhamento com inserção de espaços (*gaps*). O alinhamento da hemoglobina α e da mioglobina após a inserção de um espaço (*gap*) na sequência da hemoglobina α.

O significado estatístico dos alinhamentos pode ser estimado por embaralhamento

As semelhanças de sequência na Figura 6.5 parecem notáveis; contudo, ainda existe a possibilidade de que um grupo de identidades de sequência tenha ocorrido apenas por acaso. Como as proteínas são compostas pelo mesmo conjunto de 20 monômeros de aminoácidos, o alinhamento de duas proteínas quaisquer não relacionadas produzirá algumas identidades, particularmente se for feita a introdução de espaços. Mesmo se duas proteínas tiverem uma composição idêntica de aminoácidos, elas podem não estar ligadas pelo processo da evolução. É a ordem dos resíduos dentro de suas sequências que determina a existência de uma relação entre elas. Por conseguinte, podemos avaliar o significado de nosso alinhamento ao "embaralhar" ou efetuar um rearranjo aleatório de uma das sequências (Figura 6.7), repetir o alinhamento da sequência e determinar uma nova pontuação para o alinhamento. Esse processo é repetido muitas vezes para fornecer um histograma mostrando, para cada pontuação possível, o número de sequências embaralhadas que receberam essa pontuação (Figura 6.8). Se a pontuação original não for notavelmente diferente das pontuações dos alinhamentos embaralhados, então não podemos excluir a possibilidade de que o alinhamento original tenha sido

meramente uma consequência do acaso.

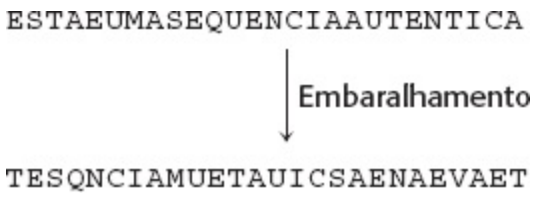


Figura 6.7 AGeração de uma sequência embaralhada.

Quando esse procedimento é aplicado às sequências da mioglobina e da hemoglobina α, o alinhamento autêntico destaca-se claramente (ver Figura 6.8). Sua pontuação está muito acima da média para as pontuações de alinhamentos com base em sequências embaralhadas. A probabilidade de ocorrência desse desvio apenas ao acaso é de aproximadamente 1 em 10^{20}. Por conseguinte, podemos confortavelmente concluir que as duas sequências são genuinamente semelhantes, e a explicação mais simples para essa semelhança é que essas sequências são homólogas – isto é, as duas moléculas descenderam por divergência de um ancestral comum.

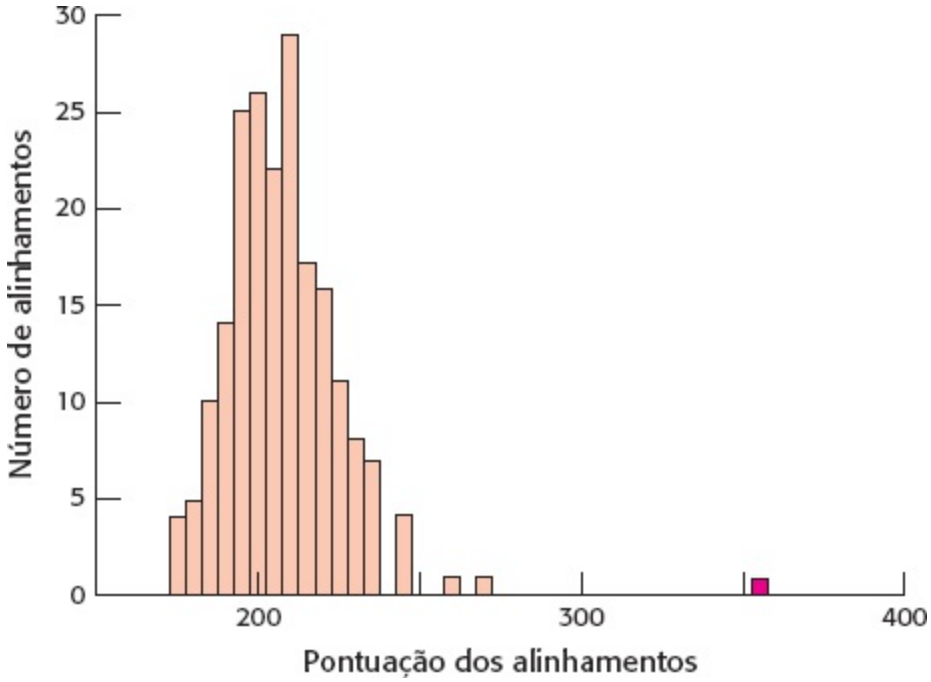


Figura 6.8 Comparação estatística das pontuações de alinhamento. Os valores de alinhamento são calculados para muitas sequências embaralhadas, e o número de sequências que geram determinada pontuação é representado graficamente em relação à pontuação. O gráfico resultante é uma distribuição das pontuações de alinhamento ocorrendo pelo acaso. A pontuação para o alinhamento da hemoglobina α e da mioglobina não embaralhadas (mostrada em vermelho) é substancialmente maior do que qualquer uma dessas pontuações, sugerindo fortemente que a semelhança de sequências é significativa.

Relações evolutivas distantes podem ser detectadas pelo uso de matrizes de substituição

O esquema de pontuação descrito até agora atribui pontos apenas para as posições ocupadas por aminoácidos idênticos nas duas sequências comparadas. Nenhum crédito é conferido a qualquer pareamento que não tenha uma identidade. Entretanto, conforme já discutido, duas proteínas relacionadas pela evolução sofrem substituições de aminoácidos à medida que divergem. Um sistema de pontuação fundamentado exclusivamente na identidade dos aminoácidos não pode considerar

essas alterações. Para obter maior sensibilidade na detecção de relações evolutivas, foram desenvolvidos métodos para comparar dois aminoácidos e avaliar o seu grau de semelhança.

Nem todas as substituições são equivalentes. Por exemplo, as mudanças de aminoácidos podem ser classificadas em estruturalmente conservadoras e não conservadoras. Uma *substituição conservadora* substitui um aminoácido por outro semelhante no tamanho e nas propriedades químicas. As substituições conservadoras podem ter apenas efeitos mínimos sobre a estrutura da proteína e, com frequência, podem ser toleradas sem comprometer a função da proteína. Em contrapartida, em uma *substituição não conservadora*, um aminoácido é substituído por outro estruturalmente diferente. As mudanças de aminoácidos também podem ser classificadas pelo número de mudanças de nucleotídios necessárias para obter a mudança correspondente de aminoácidos. Algumas substituições surgem da substituição de apenas um único nucleotídio na sequência gênica, enquanto outras necessitam de duas ou três substituições. As substituições conservadoras e de um único nucleotídio tendem a ser mais comuns do que as substituições com efeitos mais radicais.

Como podemos explicar o tipo de substituição quando comparamos as sequências? Podemos abordar esse problema ao examinar em primeiro lugar as substituições que realmente ocorreram em proteínas evolutivamente relacionadas. A partir de um exame de sequências apropriadamente alinhadas, foram deduzidas matrizes de substituição. Uma *matriz de substituição* descreve um sistema de pontuação para a substituição de qualquer aminoácido por cada um dos outros 19 aminoácidos. Nessas matrizes, uma pontuação positiva grande corresponde a uma substituição que ocorre com relativa frequência, enquanto uma pontuação negativa grande corresponde a uma substituição que só ocorre raramente. Uma matriz de substituição comumente usada, a Blosum-62 (de *B*locos de *m*atriz de *s*ubstituição de aminoácidos, do inglês *Blocks of amino acid substitution matrix*), está ilustrada na Figura 6.9. Nesta figura, cada coluna na matriz representa 1 dos 20 aminoácidos, enquanto a posição dos códigos de uma letra dentro de cada coluna especifica a pontuação para a substituição correspondente. Observe que as pontuações que correspondem à identidade (os códigos dentro de caixas na parte superior de cada coluna) não são as mesmas para cada resíduo, pois os aminoácidos de ocorrência menos frequente, como a cisteína (C) e o triptofano (W), irão se alinhar aleatoriamente com menos frequência do que os resíduos mais comuns. Além disso, as substituições estruturalmente conservadoras, como a arginina (R) por lisina (K) e a valina (V) por isoleucina (I) apresentam pontos relativamente altos, enquanto as substituições não conservadoras, como o triptofano pela lisina resultam em pontos negativos (Figura 6.10). Quando duas sequências são comparadas, cada par de resíduos alinhados recebe uma pontuação com base na matriz. Além disso, as penalidades para os espaços (*gap*) são frequentemente avaliadas. Por exemplo, a introdução de um espaço de um único resíduo diminui a pontuação do alinhamento em 12 pontos, e a extensão de um espaço existente custa 2 pontos por resíduo. Com esse sistema de pontuação, o alinhamento mostrado na Figura 6.6 recebe uma pontuação de 115. Em muitas regiões, as substituições são, em sua maioria, conservadoras (definidas como substituições com valores acima de 0) e relativamente poucas são tipos fortemente desfavorecidos (Figura 6.11).

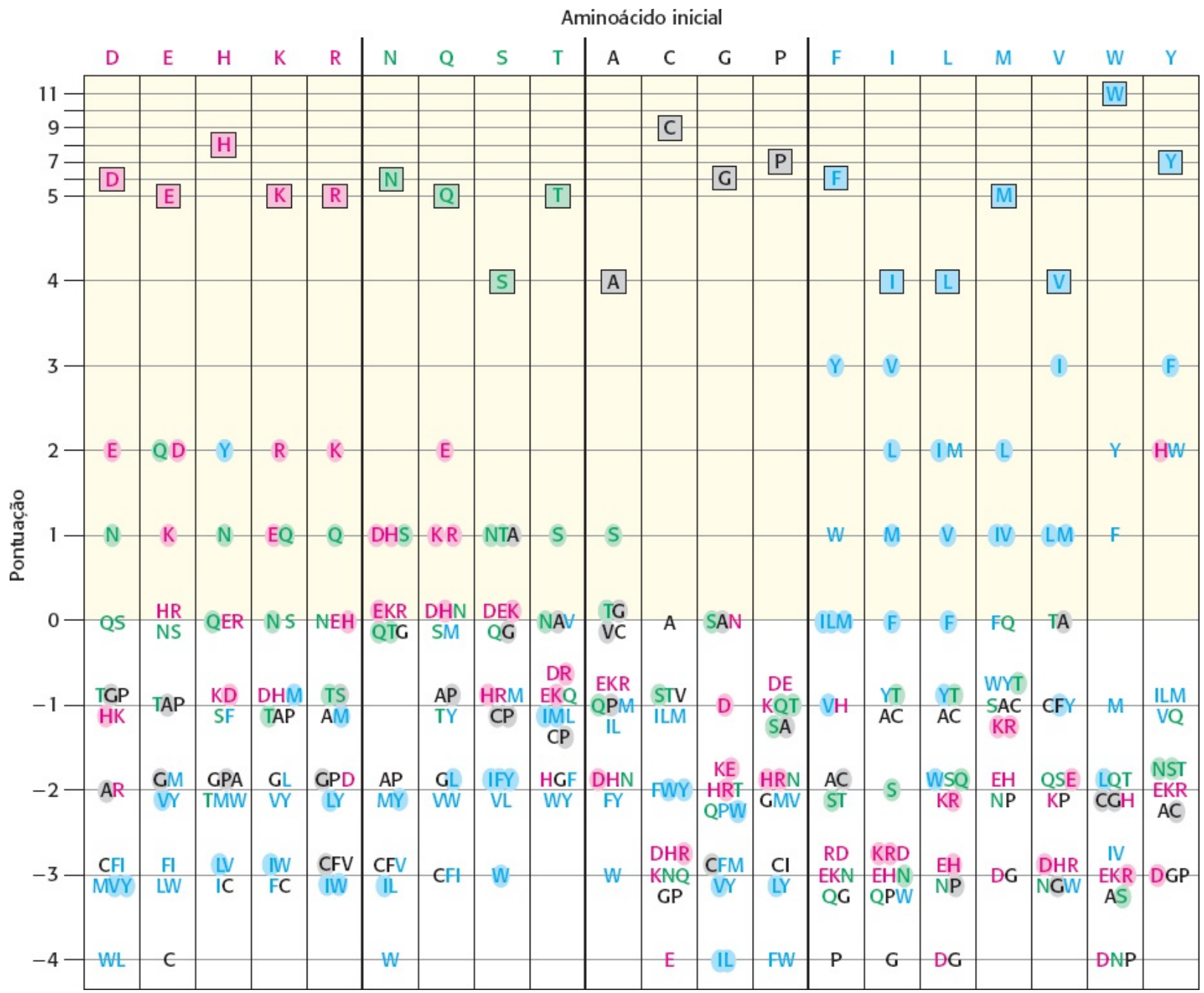


Figura 6.9 Visão gráfica da matriz de substituição Blosum-62. Esta matriz de substituição foi deduzida pelo exame de substituições que ocorre dentro de blocos de sequências alinhadas em proteínas relacionadas. Os aminoácidos são classificados em quatro grupos (com carga, em vermelho; polares, em verde; grandes e hidrofóbicos, em azul; outros, em preto). As substituições que requerem a mudança de apenas um único nucleotídio estão sombreadas. As identidades estão dentro de caixas. Para encontrar o ponto de uma substituição, de H por Y, por exemplo, procura-se o Y na coluna que tem o H na parte superior e verifica-se o número à esquerda; neste caso, o ponto resultante é 2.

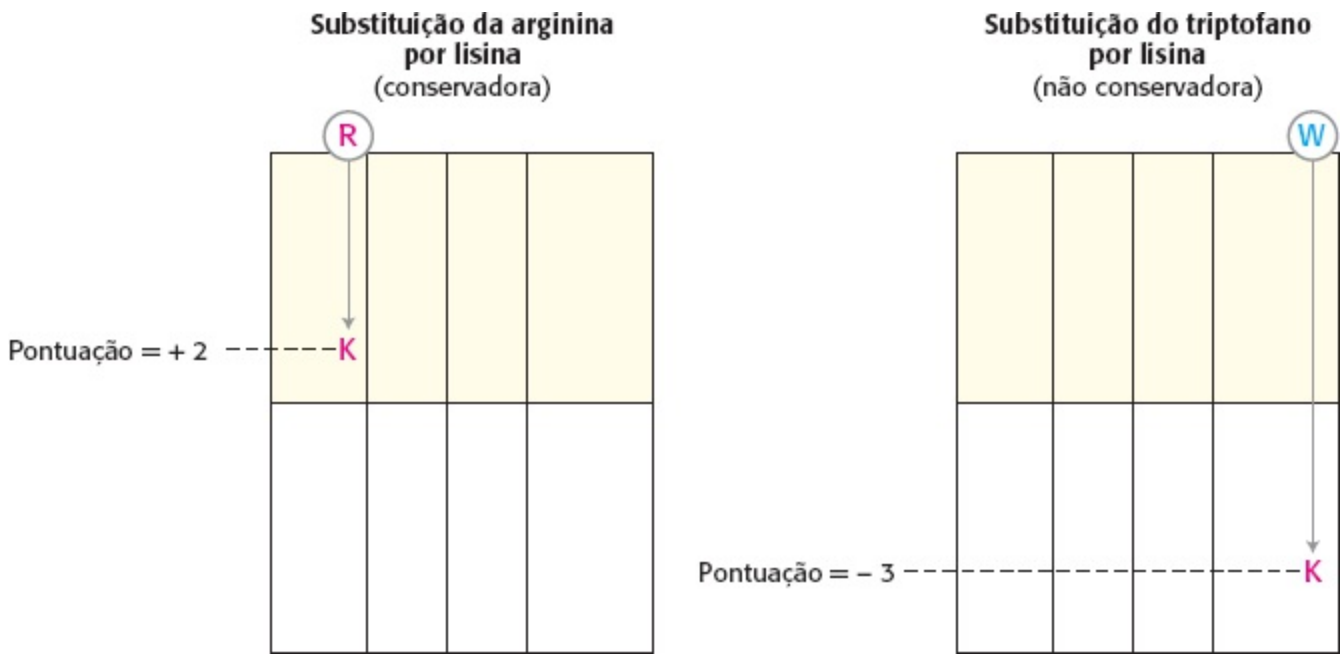


Figura 6.10 Pontuação de substituições conservadoras e não conservadoras. A matriz de substituição Blosum-62 indica que a substituição conservadora (arginina por lisina) recebe uma pontuação positiva, enquanto uma substituição não conservadora (triptofano por lisina) tem uma pontuação negativa. A matriz está representada como forma abreviada da Figura 6.9.

Figura 6.11 Alinhamento com substituições conservadoras assinaladas. O alinhamento da hemoglobina α e da mioglobina com substituições conservadoras indicadas por sombreamento em amarelo e identidades em laranja.

Esse sistema de pontuação detecta homologia entre sequências menos obviamente relacionadas com maior sensibilidade do que apenas uma comparação de identidades. Considere, por exemplo, a proteína leg-hemoglobina, uma proteína fixadora de oxigênio encontrada nas raízes de algumas plantas. A sequência de aminoácidos da leg-hemoglobina do tremoço pode ser alinhada com a da mioglobina humana e pontuada utilizando o esquema simples de pontuação com base apenas nas identidades ou na matriz Blosum-62 (ver Figura 6.9). O embaralhamento repetido e a pontuação fornecem uma distribuição dos valores de alinhamento (Figura 6.12). A pontuação fundamentada exclusivamente nas identidades indica que a probabilidade de alinhamento entre a mioglobina e a leg-hemoglobina ocorrendo de modo aleatório é de 1 em 20. Por conseguinte, embora o nível de semelhança sugira uma relação, existe uma probabilidade de 5% de que a semelhança seja acidental com base nessa análise. Em contrapartida, os usuários da matriz de substituição são capazes de incorporar os efeitos das substituições conservadoras. A partir desse tipo de análise, as chances de o alinhamento ocorrer de modo aleatório são calculadas em aproximadamente 1 em 300. Por conseguinte, uma análise realizada com o uso da matriz de substituição chega a uma conclusão mais firme acerca da relação evolutiva entre essas proteínas (Figura 6.13).

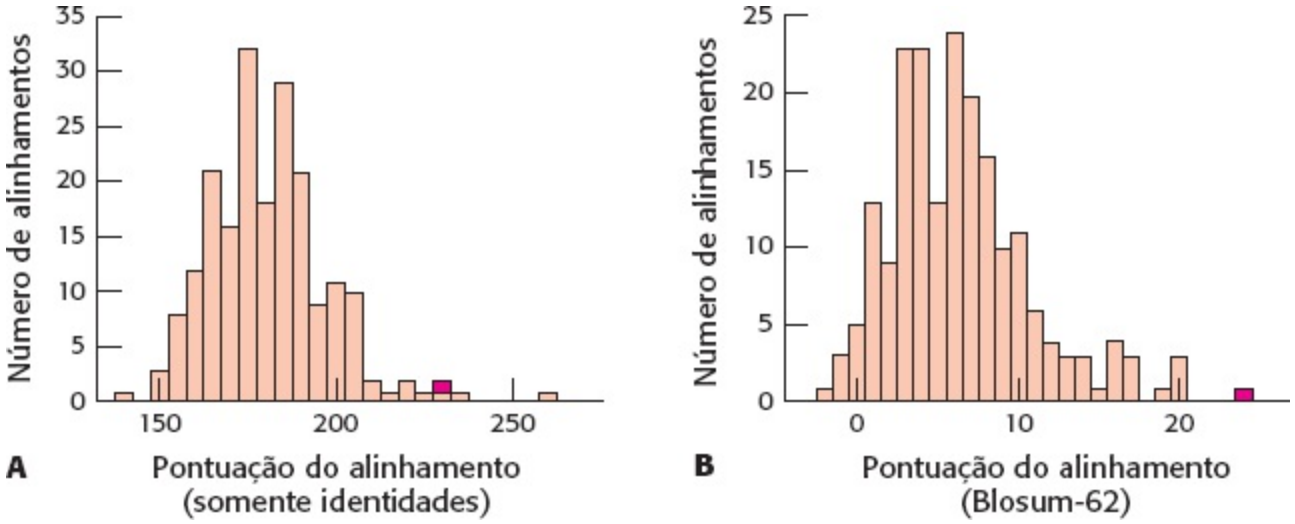


Figura 6.12 Alinhamento de identidades apenas *versus* Blosum-62. O embaralhamento repetido e a pontuação revelam o significado do alinhamento de sequências para a mioglobina humana *versus* a leg-hemoglobina do tremoço com o uso de (**A**) o sistema de pontuação simples com base em identidades ou (**B**) a matriz de substituição Blosum-62. As pontuações para o alinhamento das sequências autênticas são apresentadas em vermelho. A semelhança de aminoácidos além da identidade revela maior separação entre o alinhamento autêntico e a população de alinhamentos embaralhados.

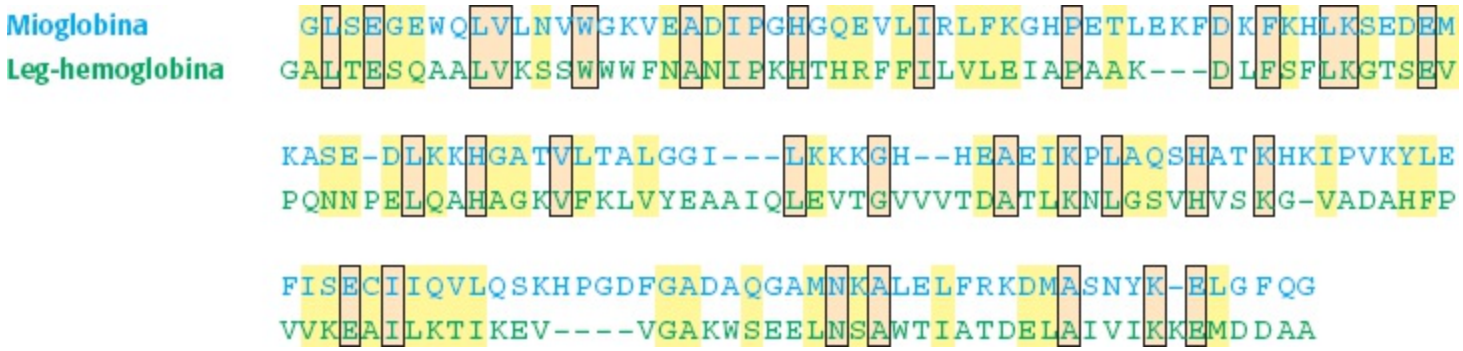


Figura 6.13 Alinhamento da mioglobina humana e da leg-hemoglobina do tremoço. O uso da matriz de substituição Blosum-62 produz o alinhamento mostrado entre a mioglobina humana e a leg-hemoglobina do tremoço, ilustrando as identidades (caixas em laranja) e as substituições conservadoras (em amarelo). Essas sequências são 23% idênticas.

A experiência com a análise de sequências levou ao desenvolvimento de "regras *de ouro*". Para sequências com mais de 100 aminoácidos, as identidades de sequências acima de 25% quase certamente não são o resultado apenas do acaso; essas sequências são provavelmente homólogas. Em contrapartida, se duas sequências tiverem menos de 15% de identidade, é pouco provável que seu alinhamento indique uma semelhança estatisticamente significativa. Para sequências com identidades de 15 e 25%, é necessária uma análise maior para determinar o significado estatístico do alinhamento. É preciso ressaltar que a ausência *de um grau estatisticamente significativo de semelhança de sequência não exclui a homologia.* As sequências de muitas proteínas que descendem de ancestrais comuns divergiram a tal ponto que a relação entre as proteínas não pode ser mais detectada com base apenas nas suas sequências. Como veremos adiante, essas proteínas homólogas frequentemente podem ser detectadas examinando-se estruturas tridimensionais.

Pesquisas em bancos de dados podem ser realizadas para identificar sequências homólogas

Quando a sequência de uma proteína é determinada pela primeira vez, a sua comparação com todas

as sequências previamente caracterizadas pode esclarecer, em muito, as relações evolutivas e, portanto, sua estrutura e função. Com efeito, uma extensa comparação das sequências quase sempre constitui a primeira análise realizada em uma sequência recém-elucidada. Os métodos de alinhamento de sequência descritos anteriormente são utilizados para comparar uma sequência individual com todos os membros de sequências conhecidas de um banco de dados.

As pesquisas em bancos de dados para sequências homólogas são realizadas mais frequentemente com recursos disponíveis na Internet no National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nih.gov). Na *pesquisa BLAST* (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*), uma sequência de aminoácidos é digitada ou copiada para um provedor, e efetua-se uma busca, mais frequentemente em um banco de dados não redundante de todas as sequências conhecidas. No final de 2009, esse banco de dados incluía mais de 10 milhões de sequências. Uma pesquisa BLAST cria uma lista de alinhamentos de sequências, cada um acompanhado de uma estimativa, dando a probabilidade de que o alinhamento tenha ocorrido por acaso (Figura 6.14).

Em 1995, pesquisadores divulgaram a primeira sequência completa do genoma de um organismo de vida livre, a bactéria *Haemophilus influenzae*. Com as sequências disponíveis, realizaram uma busca BLAST com cada sequência de proteína deduzida. Das 1.743 regiões de codificação de proteínas identificadas, também denominadas *fases de leitura aberta*, 1.007 (58%) puderam ser ligadas a alguma proteína de função conhecida que havia sido previamente caracterizada em outro organismo. Mais 347 fases de leitura aberta puderam ser ligadas às sequências nos bancos de dados às quais não havia sido ainda atribuída nenhuma função (“proteínas hipotéticas”). As 389 sequências remanescentes não correspondiam a qualquer sequência presente nos bancos de dados daquela época. Por conseguinte, os pesquisadores foram capazes de identificar funções prováveis para mais da metade das proteínas desse organismo apenas pela comparação das sequências.

Figura 6.14 Resultados de busca com BLAST. Parte dos resultados de uma pesquisa com BLAST do banco de dados não redundante (NR) de sequências de proteínas utilizando a sequência da ribose 5-fosfato isomerase (também denominada fosfopentose isomerase, Capítulo 20) de *E. coli* como consulta. Entre as milhares de sequências encontradas está a sequência ortóloga de seres humanos, e mostra-se o alinhamento entre essas sequências (destacado em amarelo). O número de sequências com esse nível de similaridade esperado no banco de dados pelo acaso é de 1×10^{-23}, conforme mostrado pelo valor E (destacado em vermelho). Como esse valor é muito menor do que 1, o alinhamento da sequência observado é altamente significativo.

6.3 O exame da estrutura tridimensional amplia nossa compreensão das relações evolutivas

A comparação de sequências é uma poderosa ferramenta para ampliar nossos conhecimentos sobre a função e o parentesco das proteínas. Entretanto, as biomoléculas geralmente funcionam como complexas estruturas tridimensionais, e não como polímeros lineares. Ocorrem mutações no nível da sequência, porém os efeitos dessas mutações são observados quanto à função, e esta última está diretamente relacionada com a estrutura terciária. Consequentemente, para compreendermos mais profundamente as relações evolutivas entre as proteínas, precisamos examinar as estruturas tridimensionais, particularmente em associação com as informações da sequência. As técnicas de determinação das estruturas são apresentadas no Capítulo 3.

A estrutura terciária é mais conservada do que a primária

Como a estrutura tridimensional está muito mais estreitamente associada à função do que a sequência, a estrutura terciária é mais conservada na evolução do que a estrutura primária. Essa conservação é aparente nas estruturas terciárias das globinas (Figura 6.15), que são extremamente semelhantes, embora a semelhança entre a mioglobina humana e a leg-hemoglobina do tremoço quase não seja detectável no nível da sequência, e aquela entre a hemoglobina α-humana e a leg-hemoglobina do tremoço não seja estatisticamente significativa (15,6% de identidade). Essa semelhança estrutural estabelece firmemente que o arcabouço que liga o grupo heme e facilita a ligação reversível de oxigênio foi conservado por um longo período evolutivo.

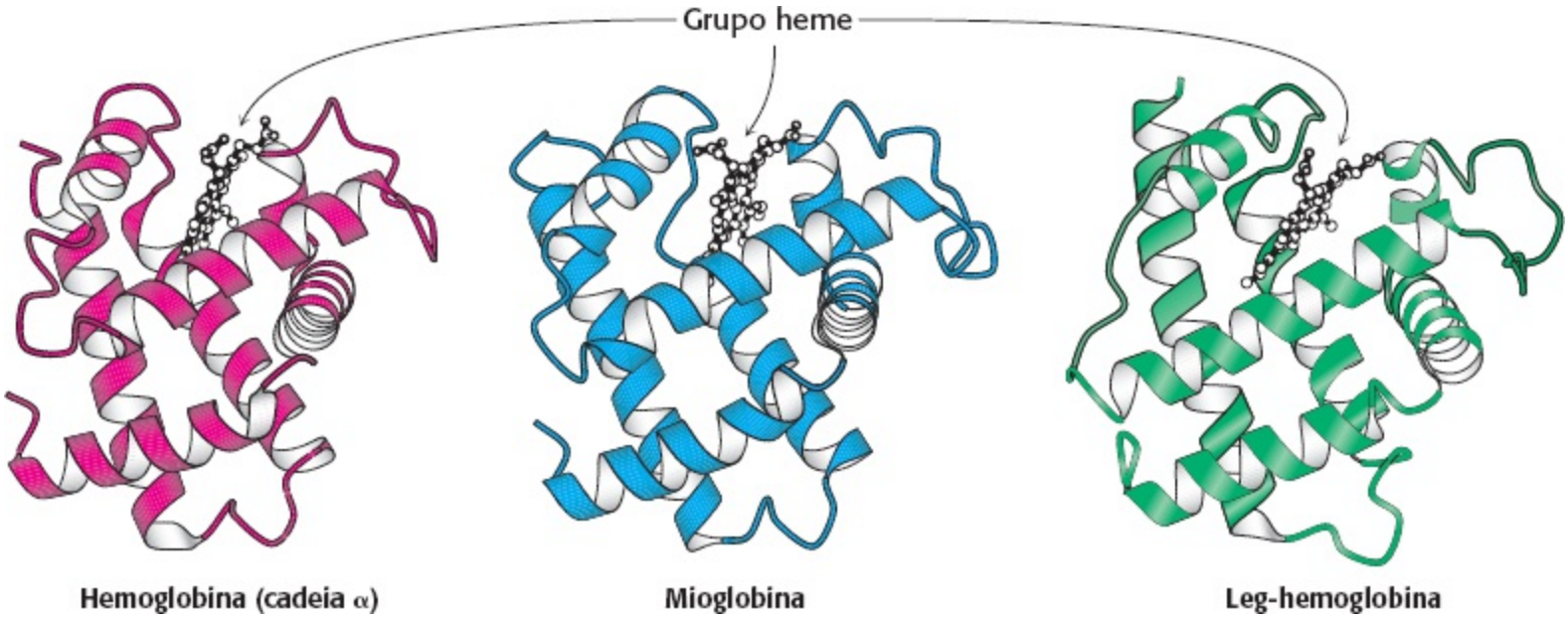


Figura 6.15 Conservação da estrutura tridimensional. As estruturas terciárias da hemoglobina humana (cadeia α), mioglobina humana e a leg-hemoglobina do tremoço são conservadas. Cada grupo heme contém um átomo de ferro ao qual se liga o oxigênio. [Desenhada a partir de 1HBB.pdb, 1MBD.pdb e 1GDJ.pdb.]

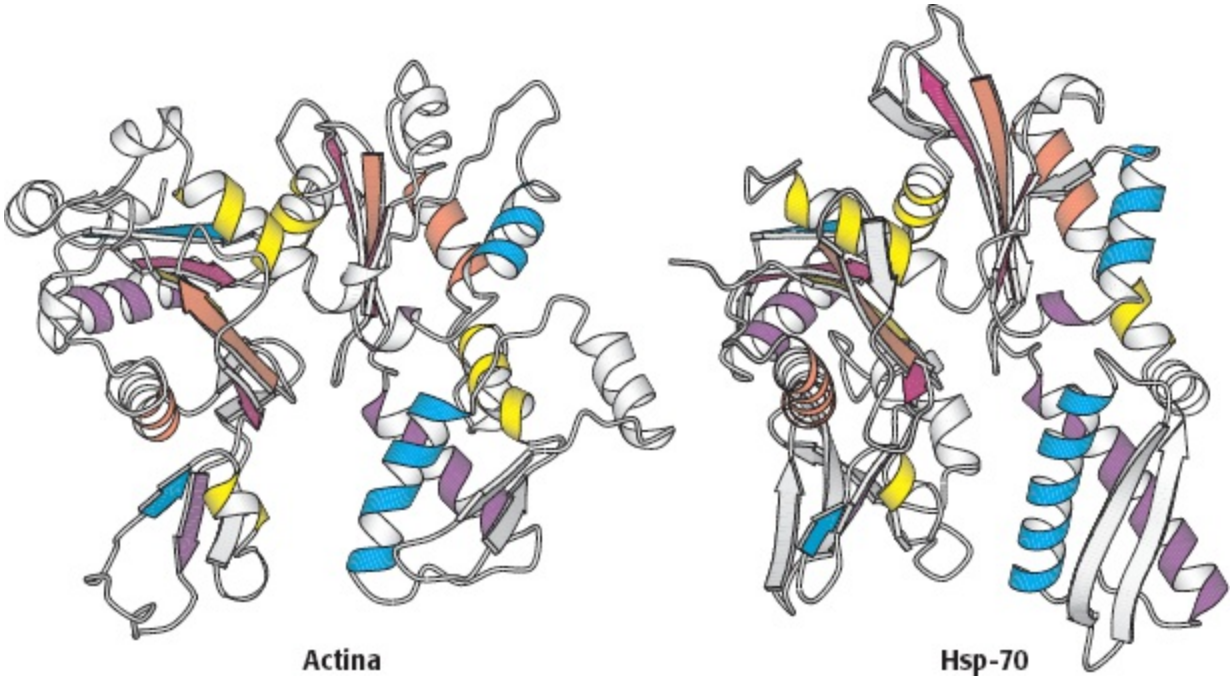


Figura 6.16 Estrutura da actina e de um grande fragmento da proteína de choque térmico 70 (Hsp-70). Uma comparação dos elementos coloridos de modo idêntico da estrutura secundária revela semelhanças globais de estrutura, apesar da diferença nas atividades bioquímicas. [Desenhada a partir de 1ATN.pdb e 1ART.pdb.]

Qualquer pessoa que conheça as funções bioquímicas semelhantes da hemoglobina, da mioglobina e da leg-hemoglobina pode esperar semelhanças estruturais entre elas. Todavia, em muitos outros casos, a comparação das estruturas tridimensionais tem revelado notáveis semelhanças entre proteínas das quais *não* se esperava nenhuma relação com base nas suas funções diversas. Este é o caso da proteína actina, um importante componente do citoesqueleto (Seção 35.2) e da proteína do choque térmico 70 (Hsp-70), que ajuda no enovelamento de proteínas dentro das células. Foi constatado que essas duas proteínas são notavelmente semelhantes na sua estrutura, apesar de uma identidade de sequência de apenas 15,6% (Figura 6.16). Com base em suas estruturas tridimensionais, a actina e a Hsp-70 são parálogas. O nível de semelhança estrutural sugere fortemente que, apesar de seus papéis biológicos diferentes nos organismos modernos, essas proteínas descendem de um ancestral comum. À medida que são determinadas as estruturas tridimensionais de mais proteínas, esses parentescos inesperados são descobertos com frequência crescente. A pesquisa desses parentescos depende mais frequentemente de buscas auxiliadas por programas computacionais, que são capazes de comparar a estrutura tridimensional de qualquer proteína com todas as outras estruturas conhecidas.

O conhecimento das estruturas tridimensionais pode ajudar na avaliação dos alinhamentos de sequências

Os métodos de comparação de sequências descritos até agora tratam igualmente todas as posições dentro de uma sequência. Todavia, com base no exame de famílias de proteínas homólogas para as quais pelo menos uma estrutura tridimensional é conhecida, sabemos que regiões e resíduos críticos para a função da proteína são mais fortemente conservados do que outros resíduos. Por exemplo, cada tipo de globina contém um grupo heme ligado com átomo de ferro em seu centro. Um resíduo de histidina que interage diretamente com esse átomo de ferro (resíduo 64 na mioglobina humana) é conservado em todas as globinas. Após identificarmos os resíduos essenciais ou as sequências

altamente conservadas dentro de uma família de proteínas, podemos algumas vezes identificar outros membros da família, mesmo quando o nível global de semelhança de sequência está abaixo do significado estatístico. Por conseguinte, pode ser útil gerar uma *sequência modelo* (*sequence template*) – um mapa de resíduos conservados que são estrutural e funcionalmente importantes e que são característicos de determinadas famílias de proteínas, tornando possível reconhecer novos membros da família que poderiam ser indetectáveis por outros métodos. Estão sendo também desenvolvidos vários outros métodos para a classificação de sequência, que se baseiam nas estruturas tridimensionais conhecidas. Outros métodos ainda são capazes de identificar resíduos conservados dentro de uma família de proteínas homólogas, mesmo sem uma estrutura tridimensional conhecida. Com frequência, esses métodos utilizam matrizes de substituição que diferem em cada posição dentro de uma família de sequências alinhadas. Esses métodos frequentemente podem detectar relações evolutivas muito distantes.

Motivos repetidos podem ser detectados pelo alinhamento das sequências com elas mesmas

Mais de 10% de todas as proteínas contêm conjuntos de dois ou mais domínios que se assemelham entre si. Métodos de busca de sequência frequentemente podem detectar sequências repetidas internamente, que foram caracterizadas em outras proteínas. Todavia, com frequência, as unidades repetidas não correspondem aos domínios previamente identificados. Nesses casos, a sua presença pode ser detectada, tentando alinhar uma determinada sequência com ela mesma. O significado estatístico dessas repetições pode ser testado alinhando-se as regiões em questão, como se elas fossem sequências de proteínas separadas. Para a proteína de ligação à caixa *TATA* (TATA box), uma proteína essencial no controle da transcrição gênica (Seção 29.2), esse alinhamento é altamente significativo: 30% de aminoácidos são idênticos em 90 resíduos (Figura 6.17A). A probabilidade estimada da ocorrência de alinhamento desse tipo por acaso é de 1 em 10^{13}. A determinação da estrutura tridimensional da proteína de ligação à caixa TATA confirmou a presença de estruturas repetidas; a proteína é formada por dois domínios quase idênticos (Figura 6.17B). Há grande evidência de que o gene que codifica essa proteína evoluiu por duplicação de um gene que codifica um único domínio.

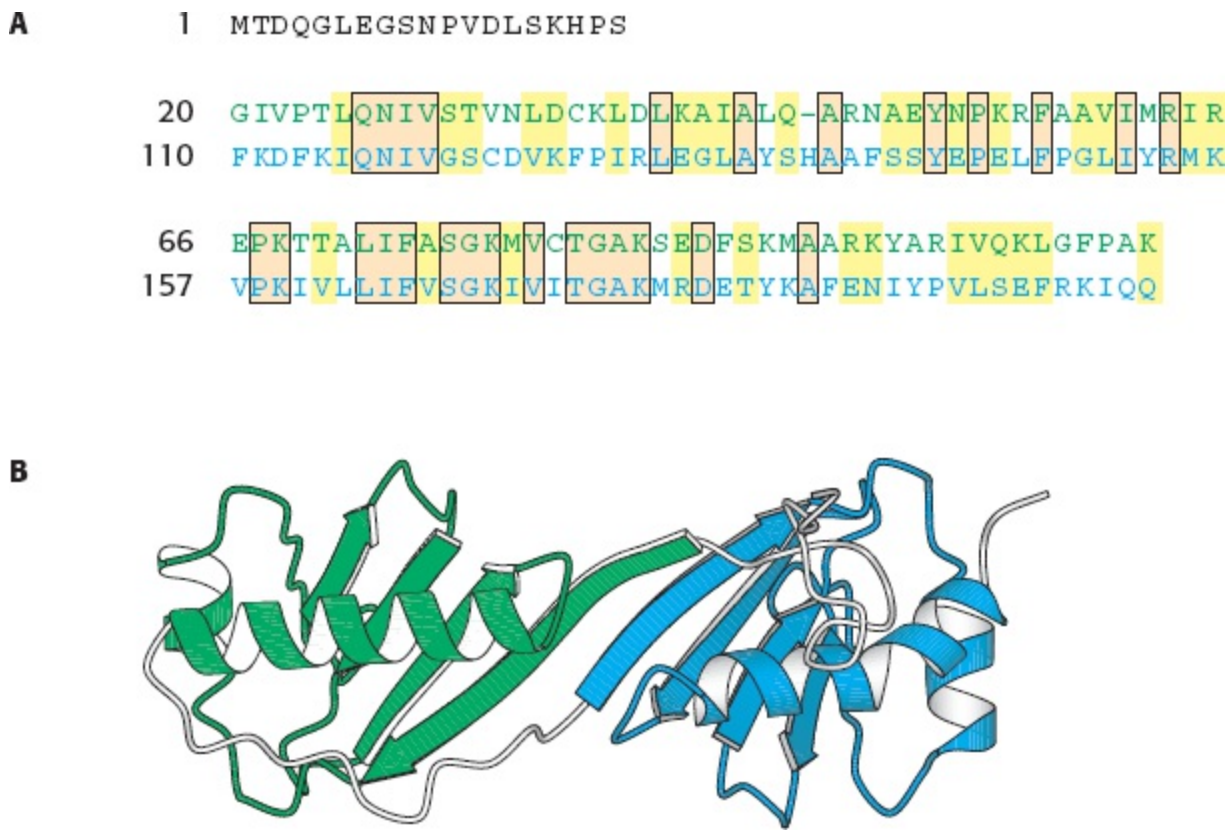


Figura 6.17 Alinhamento de sequências de repetições internas. **A**. Um alinhamento das sequências das duas repetições da proteína de ligação à caixa TATA. A repetição aminoterminal é mostrada em verde, e a repetição carboxiterminal é mostrada em azul. **B.** Estrutura da proteína de ligação da caixa TATA. O domínio aminoterminal é mostrado em verde, e o domínio carboxiterminal é mostrado em azul. [Desenhada a partir de 1VOK.pdb.]

A evolução convergente ilustra soluções comuns para desafios bioquímicos

Até agora, exploramos proteínas derivadas de ancestrais comuns – isto é, por *evolução divergente*. Foram encontrados outros casos de proteínas que são estruturalmente semelhantes em outros aspectos importantes, mas que não descendem de um ancestral comum. Como duas proteínas não relacionadas poderiam se tornar semelhantes estruturalmente? Duas proteínas evoluindo independentemente podem ter convergido para uma estrutura semelhante, a fim de desempenhar uma atividade bioquímica similar. Talvez essa estrutura tenha sido uma solução particularmente efetiva para um problema bioquímico enfrentado pelos organismos. O processo pelo qual vias evolutivas muito diferentes levam à mesma solução é denominado *evolução convergente*.

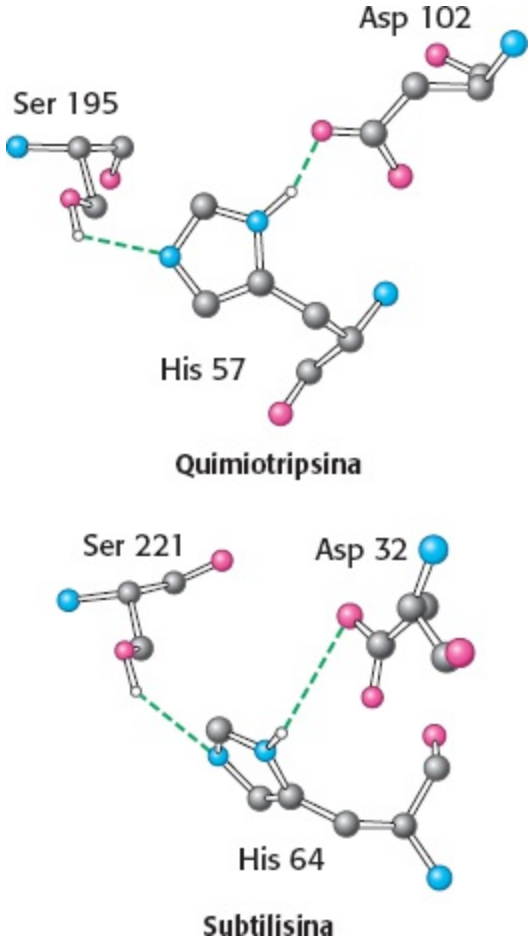


Figura 6.18 Evolução convergente dos sítios ativos de proteases. As posições relativas dos três resíduos essenciais mostrados são quase idênticas nos sítios ativos das serina proteases, quimiotripsina e subtilisina.

Um exemplo de evolução convergente é encontrado entre as serina proteases. Essas enzimas, que serão tratadas com mais detalhes no Capítulo 9, clivam ligações peptídicas por hidrólise. A Figura 6.18 mostra as estruturas dos sítios ativos – isto é, os sítios nas proteínas onde ocorre a reação de hidrólise – para duas dessas enzimas, a quimiotripsina e a subtilisina. Essas estruturas dos sítios ativos são notavelmente semelhantes. Em cada caso, um resíduo de serina, um resíduo de histidina e um resíduo de ácido aspártico estão posicionados no espaço em arranjos quase idênticos. Como veremos, esse arranjo espacial conservado é crítico para a atividade dessas enzimas e proporciona a mesma solução mecanística para o problema da hidrólise de peptídios. À primeira vista, essa semelhança pode sugerir que essas proteínas sejam homólogas. Entretanto, as notáveis diferenças observadas nas estruturas globais dessas proteínas tornam uma relação evolutiva extremamente improvável (Figura 6.19). Enquanto a quimiotripsina é constituída quase totalmente de folhas β, a subtilisina contém uma extensa estrutura de α-hélices. Além disso, os resíduos essenciais de serina, histidina e ácido aspártico não ocupam posições semelhantes, nem mesmo aparecem na mesma ordem dentro das duas sequências. É extremamente improvável que duas proteínas que evoluíram de um ancestral comum tenham retido estruturas semelhantes dos sítios ativos, enquanto outros aspectos da estrutura mudaram de modo tão radical.

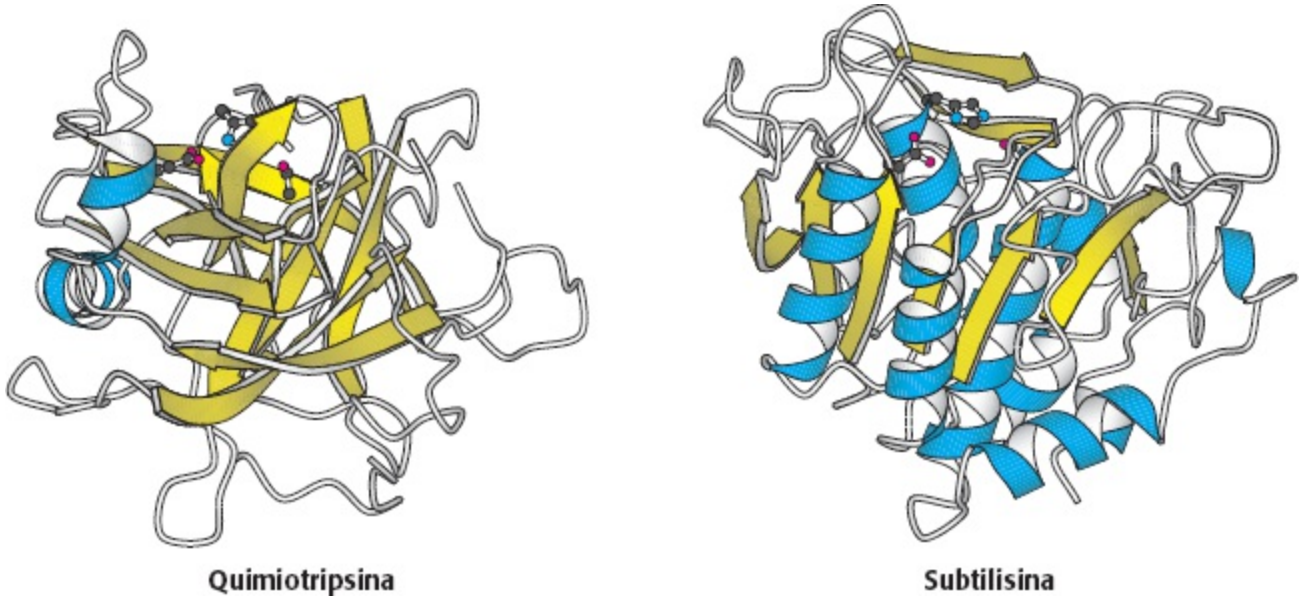


Figura 6.19 Estruturas da quimiotripsina de mamíferos e da subtilisina bacteriana. As estruturas globais são muito diferentes, em acentuado contraste com os sítios ativos, mostrados na parte superior de cada estrutura. As fitas β são mostradas em amarelo, e as α-hélices, em azul. [Desenhada a partir de 1GTC.pdb. e 1SUP.pdb.]

A comparação das sequências de RNA podem constituir uma fonte de esclarecimento das estruturas secundárias do RNA

As sequências homólogas de RNA podem ser comparadas de modo semelhante ao já descrito para as sequências de proteínas. Essas comparações podem constituir uma importante fonte de esclarecimento sobre as relações evolutivas; além disso, fornecem indícios sobre a estrutura tridimensional do próprio RNA. Conforme assinalado no Capítulo 4, as moléculas de ácido nucleico de fita simples dobram-se sobre si mesmas, formando estruturas elaboradas que são mantidas unidas por pareamento de bases de Watson-Crick e outras interações. Em uma família de sequências que formam estruturas de pareamento de bases semelhantes, as sequências de bases podem variar, porém a capacidade de pareamento de bases é conservada. Considere, por exemplo, uma região de uma grande molécula de RNA presente nos ribossomos de todos os organismos (Figura 6.20). Na região mostrada, a sequência de *E. coli* tem um resíduo de guanina (G) na posição 9 e um resíduo de citosina (C) na posição 22, enquanto a sequência humana tem uracila (U) na posição 9 e adenina (A) na posição 22. O exame das seis sequências mostradas na Figura 6.20 revela que as bases nas posições 9 e 22, bem como várias das posições adjacentes, conservam a capacidade de formar pares de bases de Watson-Crick, muito embora as identidades das bases nessas posições variem. Podemos deduzir que dois segmentos com mutações pareadas que mantêm a capacidade de pareamento de bases tendem a formar uma dupla hélice. Para várias moléculas homólogas de RNA cujas sequências são conhecidas, esse tipo de análise de sequência frequentemente pode sugerir estruturas secundárias completas, bem como algumas interações adicionais. Para esse RNA ribossômico específico, a determinação subsequente de sua estrutura tridimensional (Seção 30.3) confirmou a estrutura secundária predita.

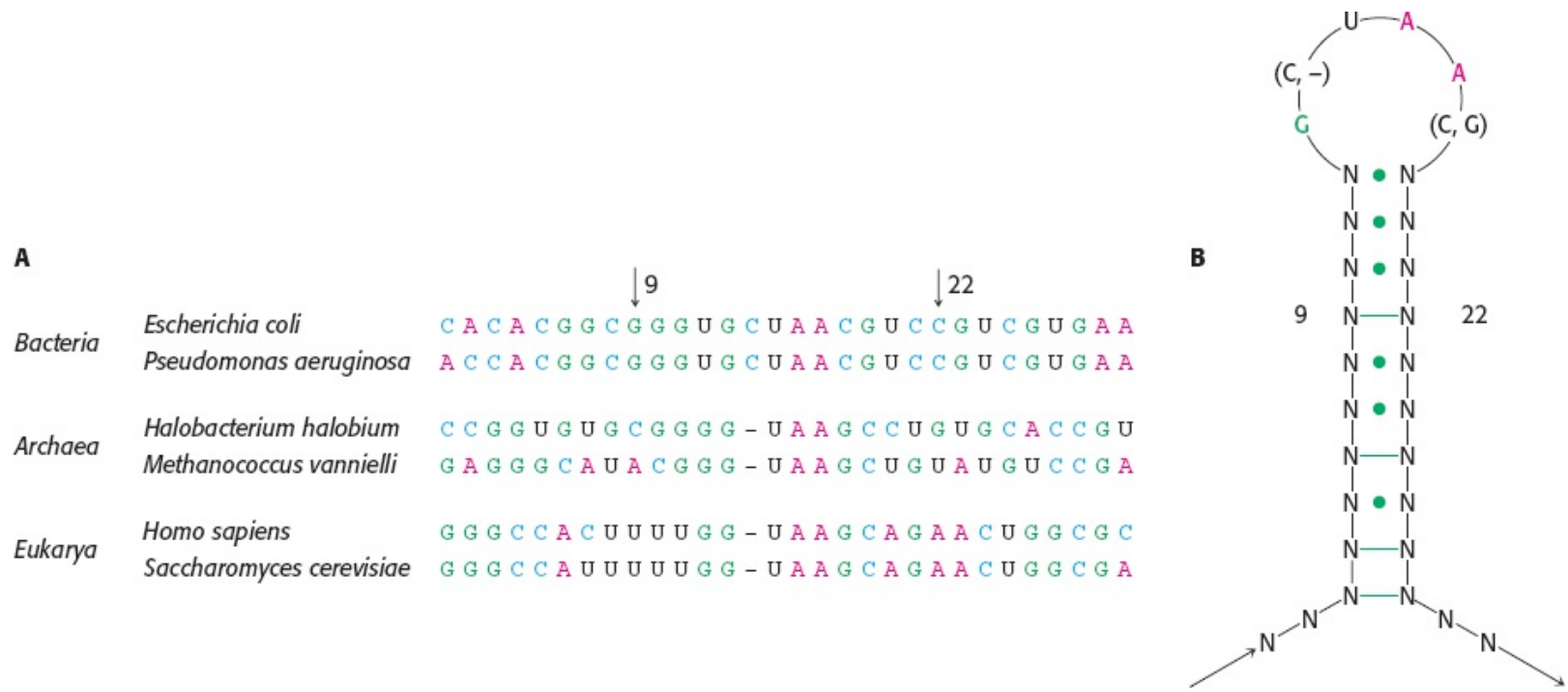


Figura 6.20 Comparação de sequências de RNA. A. Comparação das sequências em uma parte do RNA ribossômico obtido de uma variedade de espécies. **B.** A estrutura secundária deduzida. As barras verdes indicam as posições nas quais o pareamento de bases de Watson-Crick é totalmente conservado nas sequências de bases demonstradas, enquanto os pontos indicam as posições nas quais o pareamento de base de Watson-Crick é conservado na maioria dos casos.

6.4 Árvores evolutivas podem ser construídas com base nas informações das sequências

A observação de que a homologia manifesta-se frequentemente como uma semelhança de sequência sugere que a via evolutiva que relaciona os membros de uma família de proteínas pode ser deduzida pelo exame da semelhança de sequências. Essa abordagem baseia-se na ideia de que as sequências que são mais semelhantes entre si tiveram menos tempo evolutivo para divergir do que as sequências que são menos semelhantes. Esse método pode ser ilustrado utilizando-se as três sequências de globina nas Figuras 6.11 e 6.13, bem como a sequência da cadeia β da hemoglobina humana. Essas sequências podem ser alinhadas com a restrição adicional de que os espaços (*gaps*), quando presentes, devem estar nas mesmas posições em todas as proteínas. Essas sequências alinhadas podem ser usadas para construir uma *árvore evolutiva*, cujo comprimento do ramo que conecta cada par de proteínas é proporcional ao número de diferenças de aminoácidos entre as sequências (Figura 6.21).

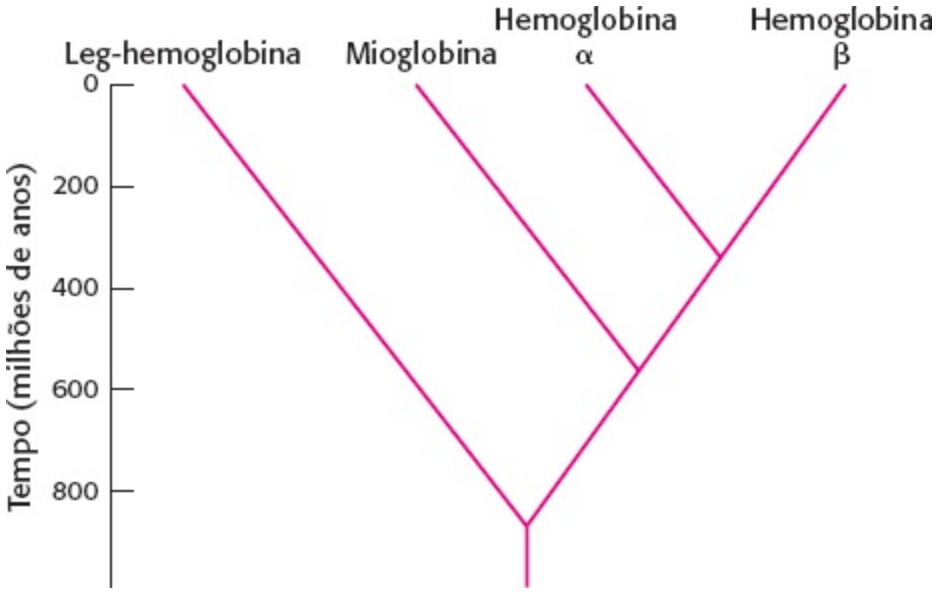


Figura 6.21 Árvore evolutiva para globinas. A estrutura ramificada foi deduzida por comparações de sequências, enquanto resultado de estudos de fósseis forneceram a escala de tempo global, mostrando o momento em que ocorreu a divergência.

Essas comparações revelam apenas os tempos relativos de divergência – por exemplo, a mioglobina divergiu da hemoglobina há um tempo duas vezes maior do que a cadeia α divergiu da cadeia β. Como podemos estimar as datas aproximadas de duplicação gênica e outros eventos evolutivos? As árvores evolutivas podem ser calibradas pela comparação dos pontos de ramificação deduzidos com os tempos de divergência determinados pelos registros fósseis. Por exemplo, a duplicação que levou às duas cadeias de hemoglobina parece ter ocorrido há 350 milhões de anos. Essa estimativa é apoiada pela observação de que peixes sem mandíbulas, como a lampreia, que divergiu dos peixes ósseos há aproximadamente 400 milhões de anos, contêm hemoglobina constituída de um único tipo de subunidade (Figura 6.22).

Esses métodos podem ser aplicados tanto a moléculas relativamente modernas quanto a moléculas muito antigas como os RNA ribossômicos que são encontrados em todos os organismos. Com efeito, essa análise de sequência do RNA comprovou que as *Archaea* constituem um grupo distinto de organismos que divergiram das *Bacteria* bem no início da história evolutiva.

Figura 6.22 Lampreia. A lampreia, um peixe sem mandíbula, cujos ancestrais divergiram dos peixes ósseos, há aproximadamente 400 milhões de anos, contém moléculas de hemoglobina constituídas de apenas um tipo de cadeia polipeptídica. [Brent P. Kent.]

6.5 As técnicas modernas disponíveis possibilitam a exploração experimental da evolução

Duas técnicas de bioquímica possibilitaram examinar o curso da evolução mais diretamente, e não por simples inferência. A reação em cadeia da polimerase (PCR) (Capítulo 5) possibilita o exame direto de sequências antigas de DNA, livrando-nos, pelo menos em alguns casos, das restrições de examinar os genomas existentes apenas dos organismos vivos. A evolução molecular pode ser investigada pelo uso da *química combinatória*, o processo de produção de grandes populações de moléculas em massa e de seleção de uma propriedade bioquímica. Esse notável processo fornece uma ideia dos tipos de moléculas que podem ter existido bem no início da evolução.

O DNA antigo algumas vezes pode ser amplificado e sequenciado

A enorme estabilidade química do DNA faz com que essa molécula seja bem adaptada a seu papel como local de armazenamento da informação genética. A molécula é tão estável que amostras de DNA têm sobrevivido por muitos milhares de anos em condições apropriadas. Com o desenvolvimento dos métodos de PCR e de métodos avançados de sequenciamento de DNA, esse DNA antigo pode ser amplificado e sequenciado. Essa abordagem foi aplicada ao DNA mitocondrial de um fóssil de Neandertal, com idade estimada de 38.000 anos, encontrado na caverna de Vindija, na Croácia, em 1980. Notavelmente, os pesquisadores obtiveram o sequenciamento completo do genoma mitocondrial desse espécime. A comparação da sequência mitocondrial de Neandertal com as do *Homo sapiens* revelou entre 201 e 234 substituições, ou seja, bem menos do que as cerca de 1.500 diferenças entre os seres humanos e os chimpanzés na mesma região. Análises subsequentes sugeriram que o ancestral comum dos seres humanos modernos e Neandertais viveu há aproximadamente 660 mil anos. Uma árvore evolutiva construída a partir desses dados revelou que o Neandertal não era um intermediário entre os chimpanzés e os seres humanos, mas sim um "fim de linha" evolutivo que se tornou extinto (Figura 6.23).

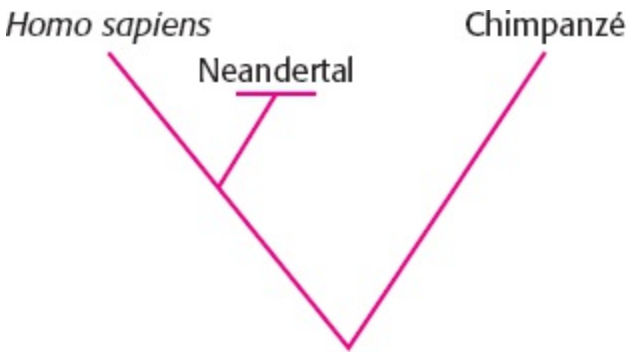


Figura 6.23 Localizando o Neandertal em uma árvore evolutiva. A comparação das sequências de DNA revelou que o Neandertal não está na linha de descendência direta que leva ao *Homo sapiens*, mas divergiu mais cedo e, em seguida, tornou-se extinto.

Alguns estudos anteriores alegam terem determinado as sequências de um DNA muito mais antigo, como aquele encontrado em insetos presos em âmbar; todavia, esses estudos parecem ter falhado. Foi constatado que a fonte dessas sequências estava contaminada com DNA moderno. O sequenciamento bem-sucedido do DNA antigo requer uma quantidade de DNA suficiente para uma identificação

confiável e uma rigorosa exclusão de todas as fontes de contaminação.

A evolução molecular pode ser examinada experimentalmente

A evolução requer três processos: (1) a geração de uma população diversa, (2) a seleção de membros com base em algum critério de aptidão e (3) a reprodução para enriquecer a população com esses membros mais adaptados. As moléculas de ácidos nucleicos são capazes de sofrer todos os três processos *in vitro* em condições apropriadas. Os resultados desses estudos nos fornecem uma ideia de como os processos evolutivos podem ter gerado atividades catalíticas e capacidades específicas de ligação – funções bioquímicas importantes em todos os sistemas vivos.

Uma população diversificada de moléculas de ácido nucleico pode ser sintetizada no laboratório por um processo de química combinatória, que produz rapidamente grandes populações de determinado tipo de molécula, como um ácido nucleico. Uma população de moléculas de determinado tamanho pode ser gerada aleatoriamente, de modo que muitas ou todas as sequências possíveis estejam presentes na mistura. Uma vez gerada uma população inicial, ela fica sujeita a um processo de seleção que isola moléculas específicas com propriedades desejadas de ligação ou de reatividade. Por fim, as moléculas que sobrevivem ao processo de seleção são replicadas com o uso de PCR; iniciadores (*primers*) são dirigidos para sequências específicas incluídas nas extremidades de cada membro da população. Os erros que ocorrem naturalmente no processo de replicação introduzem uma variação adicional na população em cada "geração".

Consideremos uma aplicação dessa abordagem. No início da evolução, antes da emergência das proteínas, as moléculas de RNA podem ter desempenhado todos os principais papéis na catálise biológica. Para entender as propriedades dos potenciais RNA catalisadores, os pesquisadores usaram os métodos já descritos para criar uma molécula de RNA capaz de se ligar à adenosina trifosfato e a nucleotídios relacionados. Foi criada uma população inicial de moléculas de RNA com 169 nucleotídios de comprimento; 120 das posições diferiam aleatoriamente, com misturas equimolares de adenina, citosina, guanina e uracila. O reservatório sintético inicial que foi utilizado continha aproximadamente 10^{14} moléculas de RNA. Observe que esse número é uma fração muito pequena do reservatório total possível de sequências de 120 bases aleatórias. A partir desse reservatório, foram selecionadas as moléculas que se ligavam ao ATP, que havia sido imobilizado em uma coluna (Figura 6.24).

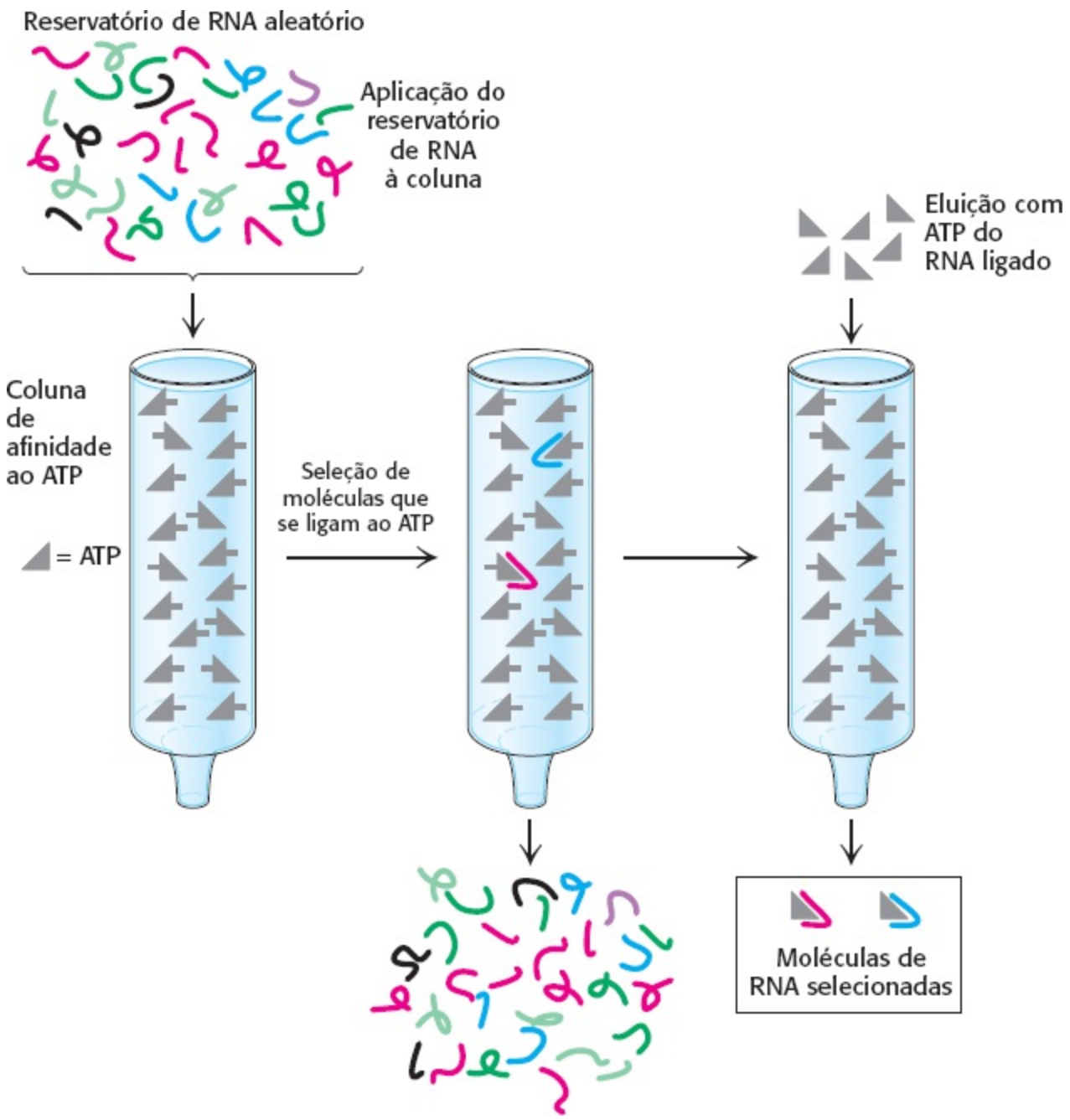


Figura 6.24 Evolução no laboratório. Uma coleção de moléculas de RNA de sequências aleatórias é sintetizada por química combinatória. Essa coleção é selecionada pela capacidade de ligação ao ATP, fazendo passar o RNA por uma coluna de afinidade pelo ATP (Seção 3.1). As moléculas de RNA que se ligam ao ATP são liberadas da coluna por lavagem com excesso de ATP e, em seguida, replicadas. O processo de seleção e de replicação é então repetido várias vezes. Os produtos finais de RNA com capacidade significativa de ligação ao ATP são isolados e caracterizados.

A coleção de moléculas que foram bem ligadas pela coluna de afinidade de ATP foram replicadas por transcrição reversa em DNA, amplificadas por PCR e transcritas de volta em RNA. Os processos de replicação um tanto sujeitos a erros introduziram mutações adicionais na população em cada ciclo. A nova população foi submetida a ciclos adicionais de seleção para a atividade de ligação ao ATP. Depois de oito gerações, os membros da população selecionada foram caracterizados por sequenciamento. Foram obtidas 17 sequências diferentes, das quais 16 podiam formar a estrutura ilustrada na Figura 6.25. Cada uma dessas moléculas ligou-se ao ATP com constantes de dissociação de menos de 50 μM.

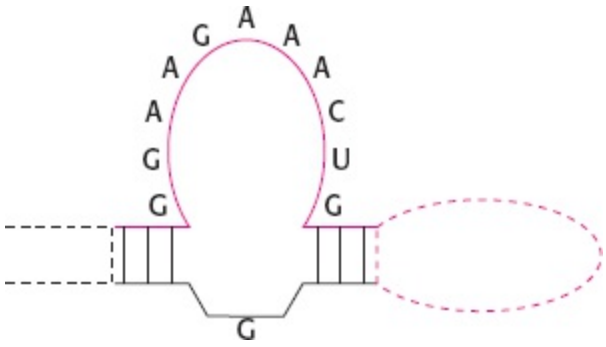


Figura 6.25 Estrutura secundária conservada. A estrutura secundária mostrada é comum às moléculas de RNA selecionadas para ligação ao ATP.

A estrutura dobrada da região de ligação ao ATP de um desses RNA foi determinada por métodos de ressonância magnética nuclear (Seção 3.6) (Figura 6.26). Conforme esperado, essa molécula de 40 nucleotídios é composta de duas regiões helicoidais de pares de bases de Watson-Crick, separadas por uma alça de 11 nucleotídios. Essa alça dobra-se sobre si mesma de modo complexo, formando uma bolsa profunda na qual o anel de adenina pode se encaixar. Assim, foi desenvolvida uma estrutura com capacidade de interação específica.

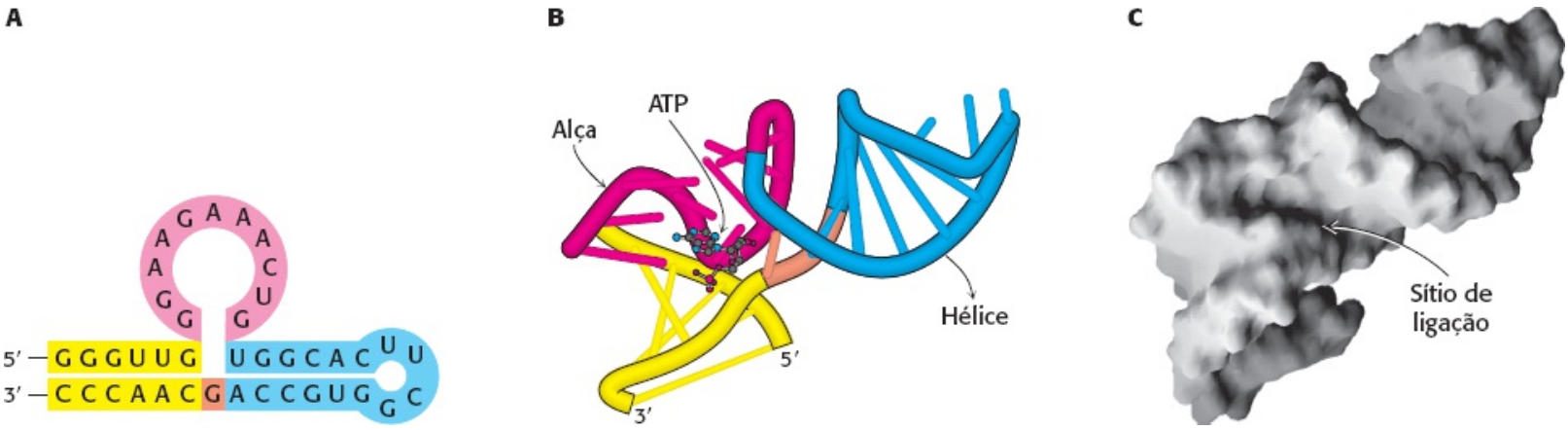


Figura 6.26 Uma molécula de RNA evoluída para ligação ao ATP. **A.** O padrão de pareamento de bases de Watson-Crick; **B.** o padrão de enovelamento; e **C.** uma representação de superfície de uma molécula de RNA selecionada para ligação a nucleotídios de adenosina. O ATP ligado é mostrado na parte B, e o sítio de ligação é revelado na forma de uma cavidade profunda na parte C.

Resumo

6.1 Os homólogos são descendentes de um ancestral comum

Explorar bioquimicamente a evolução significa investigar a existência de homologia entre as moléculas, visto que as moléculas homólogas, ou homólogos, evoluíram a partir de um ancestral comum. Os parálogos são moléculas homólogas encontradas em uma espécie e que adquiriram funções diferentes durante a evolução. Os ortólogos são moléculas homólogas que são encontradas em espécies diferentes e que desempenham funções semelhantes ou idênticas.

6.2 A análise estatística do alinhamento de sequências pode detectar a homologia

As sequências de proteínas e de ácidos nucleicos são duas das principais linguagens da

bioquímica. Os métodos de alinhamento de sequências são os mais poderosos instrumentos para a detecção evolutiva. As sequências podem ser alinhadas para tornar a sua semelhança máxima, e o significado desses alinhamentos pode ser julgado por testes estatísticos. A detecção de um alinhamento estatisticamente significativo entre duas sequências sugere fortemente que elas estão relacionadas por evolução divergente a partir de um ancestral comum. O uso de matrizes de substituição possibilita a detecção de relações evolutivas mais distantes. Qualquer sequência pode ser utilizada para sondar bancos de dados de sequências, a fim de identificar sequências relacionadas presentes no mesmo organismo ou em outros organismos.

6.3 O exame da estrutura tridimensional amplia nossa compreensão das relações evolutivas

O parentesco evolutivo entre proteínas pode ser ainda mais notavelmente evidente nas estruturas tridimensionais conservadas. A análise da estrutura tridimensional, em combinação com a análise de sequências especialmente conservadas, possibilitou determinar relações evolutivas que não podem ser detectadas por outros meios. Os métodos de comparação de sequências também podem ser usados para detectar sequências imperfeitamente repetidas dentro de uma proteína, indicando a ligação de domínios semelhantes.

6.4 Árvores evolutivas podem ser construídas com base nas informações das sequências

Árvores evolutivas podem ser construídas com a suposição de que o número de diferenças de sequência corresponde ao tempo em que as duas sequências divergiram. A construção de uma árvore evolutiva com base nas comparações de sequências revelou as épocas aproximadas dos eventos de duplicação gênica que separaram a mioglobina e a hemoglobina, bem como as subunidades α e β da hemoglobina. As árvores evolutivas com base em sequências podem ser comparadas com aquelas fundamentadas em registros fósseis.

6.5 As técnicas modernas disponíveis possibilitam a exploração experimental da evolução

A exploração da evolução também pode ser uma ciência de laboratório. Nos casos favoráveis, a amplificação por PCR de amostras bem preservadas possibilita a determinação de sequências de nucleotídios de organismos extintos. As sequências assim determinadas podem ajudar a autenticar partes de uma árvore evolutiva construída por outros meios. Experimentos de evolução molecular, realizados em tubo de ensaio, podem examinar como moléculas como as de RNA de ligação, poderiam ter sido geradas.

Palavras-chave

alinhamento de sequência (p. 178)
árvore evolutiva (p. 189)
evolução convergente (p. 187)
evolução divergente (p. 187)
homólogo (p. 176)
matriz de substituição (p. 180)

ortólogo (p. 177)
parálogo (p. 176)
pesquisa BLAST (p. 183)
química combinatória (p. 190)
sequência-modelo (p. 186)
substituição conservadora (p. 180)

Questões

1. *Qual é a pontuação?* Utilizando o sistema de pontuação com base na identidade (Seção 6.2), calcule o valor para o seguinte alinhamento. Você considera o valor estatisticamente significativo?

(1) WYLGKITRMDAEVLLKKPTVRDGHFLVTQCESSPGEF-

(2) WYFGKITRRESERLLLNPENPRGTFLVRESETTKGAY-

SISVRFGDSVQ-----HFKVLRDQNGKYYLWAVK-FN-
CLSVSDFDNAKGLNVKHYKIRKLDSGGFYITSRTQFS-

SLNELVAYHRTASVSRTHTILLSDMNV
SSLQQLVAYYSKHADGLCHRLTNV

2. *Sequência e estrutura*. Uma comparação das sequências alinhadas de aminoácidos de duas proteínas, cada uma constituída de 150 aminoácidos, revela que elas são apenas 8% idênticas. Entretanto, suas estruturas tridimensionais são muito semelhantes. Essas duas proteínas estão evolutivamente relacionadas? Explique.

3. *Depende de como se conta.* Considere os seguintes dois alinhamentos de sequência:

(a) A-SNLFDIRLIG

GSNDFYEVKIMD

(b) ASNLFDIRLI-G

GSNDFYEVKIMD

Qual desses alinhamentos tem maior pontuação se for utilizado o sistema de pontuação com base na identidade (Seção 6.2)? Qual desses dois alinhamentos tem maior pontuação se for utilizada a matriz de substituição Blosum-62 (Figura 6.9)?

4. *Descobrindo um novo par de bases.* Examine as sequências do RNA ribossômico na Figura 6.20. Nas sequências que não contêm pares de bases de Watson-Crick, qual base tende a ser pareada com G? Proponha uma estrutura para o seu novo par de bases.

5. *Sobrepujado por números.* Suponha que você queira sintetizar um reservatório de moléculas de RNA contendo todas as quatro bases a cada uma de 40 posições. Qual quantidade de RNA você precisa ter em gramas se o reservatório tiver que ter pelo menos uma única molécula de cada sequência? O peso molecular médio de um nucleotídio é de 330 g mol^{-1}.

6. *A forma segue a função*. A estrutura tridimensional das biomoléculas é mais conservada

evolutivamente do que a sequência. Por quê?

7. *Embaralhamento*. Usando o sistema de pontuação com base na identidade (Seção 6.2), calcule o valor do alinhamento para as seguintes duas sequências curtas:

(1) ASNFLDKAGK

(2) ATDYLEKAGK

Crie uma versão embaralhada da sequência 2, reordenando aleatoriamente esses 10 aminoácidos. Alinhe a sua sequência embaralhada com a sequência 1 sem permitir espaços e calcule o valor do alinhamento entre a sequência 1 e a sua sequência embaralhada.

8. *Interpretando a pontuação*. Suponha que as sequências de duas proteínas, cada uma constituída de 200 aminoácidos, são alinhadas e que a porcentagem de resíduos idênticos tenha sido calculada. Como você interpreta cada um dos seguintes resultados em relação à possível divergência das duas proteínas de um ancestral comum? (a) 80%, (b) 50%, (c) 20%, (d) 10%.

9. *Particularmente singular.* Considere a matriz de substituição Blosum-62 na Figura 6.9. A substituição de qual dos três aminoácidos nunca produz uma pontuação positiva? Que características desses resíduos poderiam contribuir para essa observação?

10. *Um conjunto de três.* As sequências de três proteínas (A, B e C) são comparadas entre si, produzindo os seguintes níveis de identidade:

	A	B	C
A	100%	65%	15%
B	65%	100%	55%
C	15%	55%	100%

Suponha que as correspondências das sequências sejam distribuídas uniformemente ao longo de cada par de sequência alinhada. Você esperaria que a proteína A e a proteína C tivessem estruturas tridimensionais semelhantes? Explique.

11. *Alinhamento do RNA.* As sequências de um fragmento de RNA de cinco espécies foram determinadas e alinhadas. Proponha uma provável estrutura secundária para esses fragmentos.

(1) UUGGAGAUUCGGUAGAAUCUCCC

(2) GCCGGGAAUCGACAGAUUCCCCG

(3) CCCAAGUCCCGGCAGGGACUUAC

(4) CUCACCUGCCGAUAGGCAGGUCA

(5) AAUACCACCCGGUAGGGUGGUUC

12. *Quanto mais, mais divertido*. Quando são utilizados alinhamentos de RNA para determinar a estrutura secundária, é vantajoso ter muitas sequências representando uma ampla variedade de espécies. Por quê?

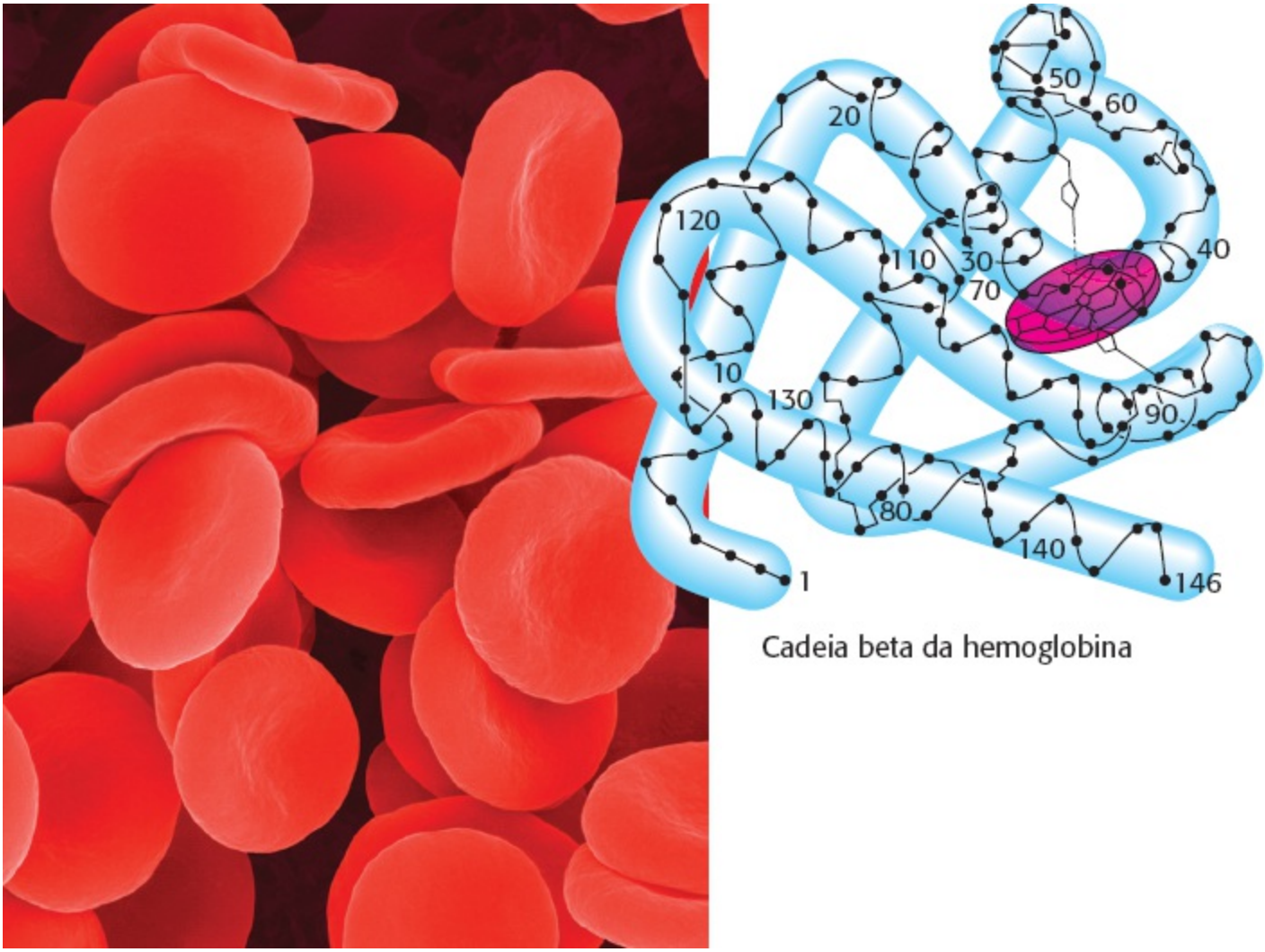
13. *Errar é humano*. Você descobriu uma forma mutante de uma DNA polimerase termoestável com fidelidade significativamente reduzida para a adição do nucleotídio adequado à fita de DNA em crescimento, em comparação com a DNA polimerase do tipo selvagem. Como esse mutante poderia ser útil nos experimentos de evolução molecular descritos na Seção 6.5?

14. *Geração após geração*. Quando se realiza um experimento de evolução molecular, como aquele descrito na Seção 6.5, por que é importante repetir as etapas de seleção e replicação por várias gerações?

15. *BLAST*. Usando o *site* National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov), encontre a sequência da enzima triose fosfato isomerase de *E. coli*. Utilize essa sequência como consulta para uma pesquisa BLAST de proteína-proteína. No resultado, encontre o alinhamento com a sequência de triose fosfato isomerase dos seres humanos (Homo sapiens). Quantas identidades são observadas no alinhamento?

Hemoglobina | Retrato de uma Proteína em Ação

7



Na corrente sanguínea, os eritrócitos transportam o oxigênio dos pulmões até os tecidos, onde a demanda de oxigênio é alta. A hemoglobina, a proteína que confere ao sangue a sua cor vermelha, é responsável pelo transporte de oxigênio por meio de suas quatro subunidades ligadas ao heme. A hemoglobina foi uma das primeiras proteínas a ter a sua estrutura determinada. O enovelamento de uma única subunidade é mostrado neste desenho feito à mão. [À esquerda, Dr. Dennis Kunkel/Visuals Unlimited.]

SUMÁRIO

7.1 O oxigênio liga-se aos átomos de ferro do heme da mioglobina e hemoglobina

7.2 A hemoglobina liga-se ao oxigênio de modo cooperativo

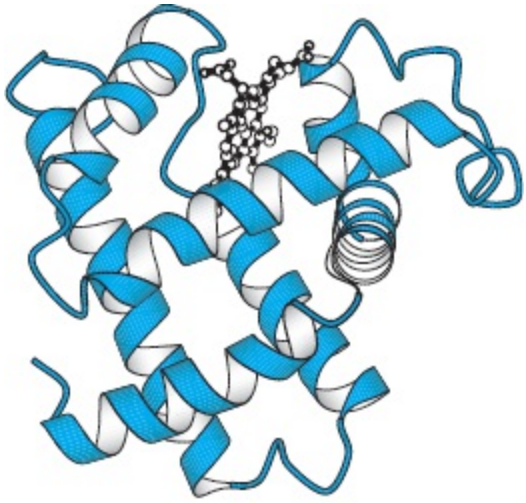
7.3 Os íons hidrogênio e o dióxido de carbono promovem a liberação de oxigênio | O efeito Bohr

7.4 Mutações nos genes que codificam as subunidades da hemoglobina podem resultar em doença

A transição da vida anaeróbica para a aeróbica foi um grande passo na evolução, visto que revelou um reservatório rico de energia. Uma quantidade quinze vezes maior de energia é extraída da glicose na presença de oxigênio do que na sua ausência. Para os organismos unicelulares e outros organismos pequenos, o oxigênio pode ser absorvido diretamente do ar ou da água circundante pelas células metabolicamente ativas. Os vertebrados desenvolveram dois mecanismos principais para fornecer às suas células um suprimento adequado de oxigênio. O primeiro desses mecanismos é um sistema circulatório que transporta ativamente o oxigênio para as células de todo o organismo. O segundo é o uso de proteínas de transporte e de armazenamento de oxigênio: a hemoglobina e a mioglobina. A hemoglobina, que é contida nos eritrócitos, é uma proteína fascinante, que transporta eficientemente o oxigênio dos pulmões para os tecidos e que também contribui para o transporte de dióxido de carbono e de íons hidrogênio de volta para os pulmões. A mioglobina, que se localiza nos músculos, fornece um suprimento de reserva de oxigênio disponível em épocas de necessidade.

A comparação entre a mioglobina e a hemoglobina ilumina alguns aspectos fundamentais da estrutura e função das proteínas. Essas proteínas relacionadas evolutivamente empregam estruturas quase idênticas para a ligação ao oxigênio (Capítulo 6). Entretanto, a hemoglobina é um carreador de oxigênio notavelmente eficiente, capaz de utilizar efetivamente até 90% de sua capacidade potencial de transporte de oxigênio. Em condições semelhantes, a mioglobina seria capaz de usar apenas 7% de sua capacidade potencial. O que explica essa enorme diferença? A mioglobina existe na forma de um polipeptídio simples, enquanto a hemoglobina é constituída de quatro cadeias polipeptídicas. As quatro cadeias da hemoglobina ligam-se ao oxigênio *cooperativamente,* o que significa que a ligação do oxigênio a um sítio em uma das cadeias aumenta a probabilidade de ligação das cadeias remanescentes ao oxigênio. Além disso, as propriedades de ligação de oxigênio da hemoglobina são moduladas pela ligação de íons hidrogênio e dióxido de carbono de um modo que aumenta a capacidade de transporte de oxigênio. Tanto a cooperatividade quanto a resposta aos moduladores são possíveis em virtude de variações na estrutura quaternária da hemoglobina quando são ligadas diferentes combinações de moléculas.

A hemoglobina e a mioglobina desempenharam papéis importantes na história da bioquímica. Foram as primeiras proteínas cujas estruturas tridimensionais foram determinadas por cristalografia de raios X. Além disso, a possibilidade de que variações na sequência de proteínas levem ao desenvolvimento de doença foi proposta e demonstrada pela primeira vez para a anemia falciforme, uma doença do sangue causada pela mutação de um único aminoácido em uma cadeia da hemoglobina. A hemoglobina foi e continua sendo uma valiosa fonte de conhecimentos e esclarecimentos, tanto por ela própria quanto como protótipo para muitas outras proteínas que iremos encontrar em nosso estudo de bioquímica.



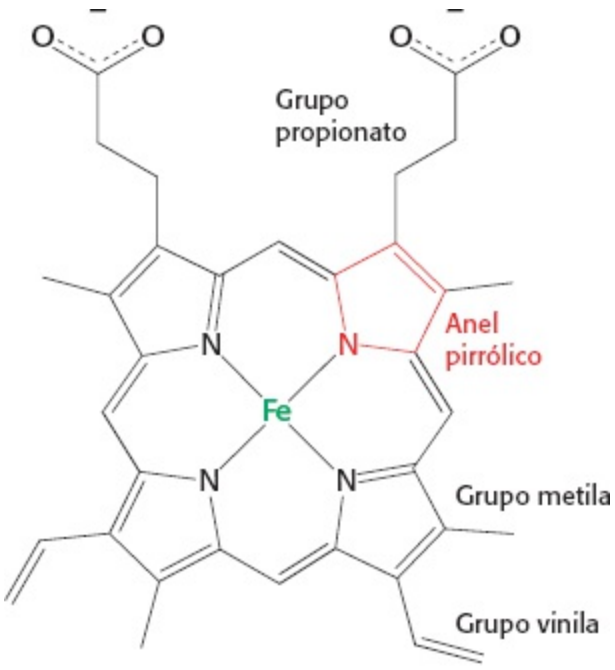
Mioglobina

Figura 7.1 Estrutura da mioglobina. *Observe* que a mioglobina é constituída de uma única cadeia polipeptídica, formada por α-hélices conectadas por voltas, com um sítio de ligação do oxigênio. [Desenhada a partir de 1MBD.pdb.]

7.1 O oxigênio liga-se aos átomos de ferro do heme da mioglobina e hemoglobina

A mioglobina do cachalote foi a primeira proteína cuja estrutura tridimensional foi determinada. Os estudos pioneiros de cristalografia de raios X realizados por John Kendrew revelaram a estrutura dessa proteína na década de 1950 (Figura 7.1). A mioglobina é constituída, em grande parte, de α-hélices que estão ligadas umas às outras por voltas, formando uma estrutura globular.

A mioglobina pode existir em uma forma livre de oxigênio, denominada *desoximioglobina*, ou em uma forma com uma molécula de oxigênio ligada, denominada *oximioglobina*. A capacidade de ligação de oxigênio pela mioglobina e pela hemoglobina depende da presença de um grupo prostético ligado, denominado *heme*.



Heme
(Fe-protoporfirina IX)

O grupo heme confere ao músculo e ao sangue a sua cor vermelha distinta. É constituído de um componente orgânico e de um átomo de ferro central. O componente orgânico, denominado *protoporfirina*, é constituído de quatro anéis pirrólicos ligados por pontes de metina, formando um anel tetrapirrólico. São ligados dois grupos metila, dois grupos vinila e duas cadeias laterais de propionato.

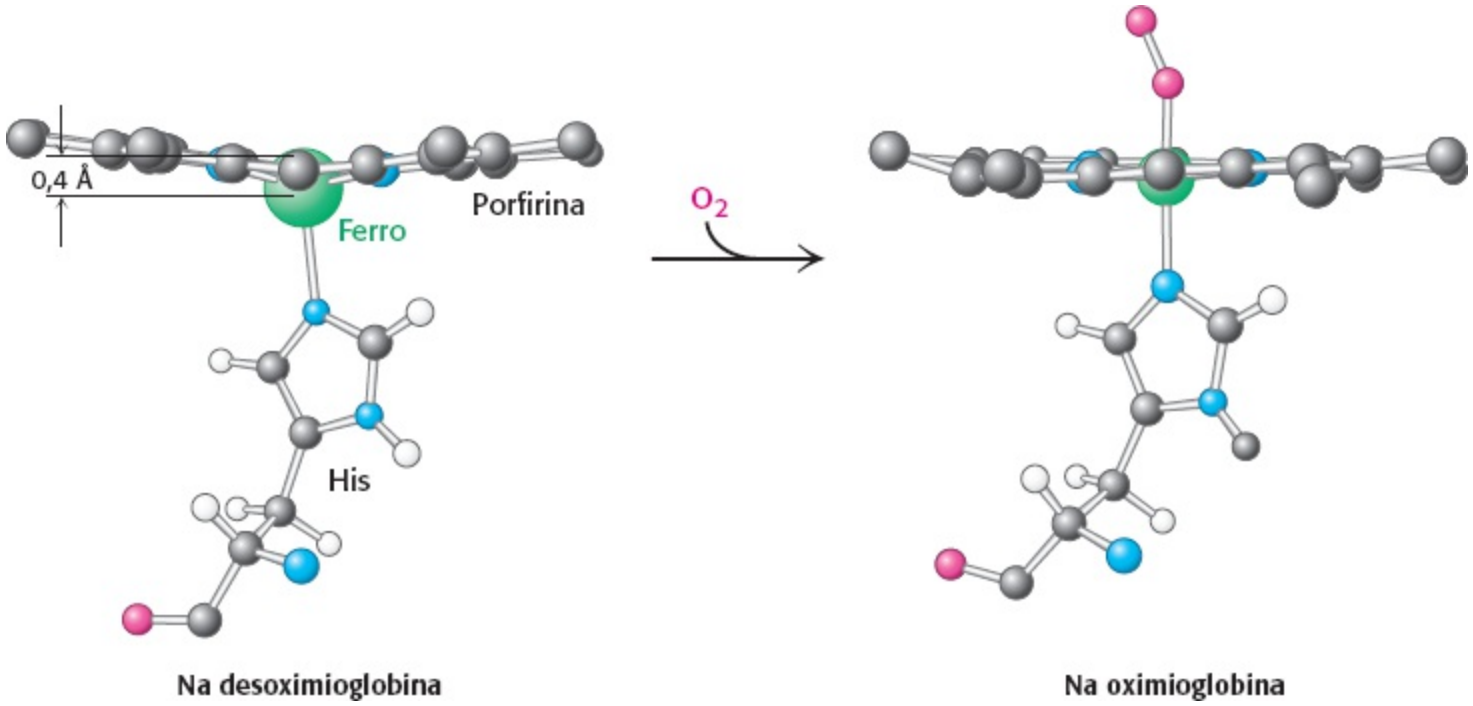


Figura 7.2 A ligação do oxigênio modifica a posição do íon ferro. O íon ferro situa-se ligeiramente fora do plano da porfirina no heme da desoxi-hemoglobina (à esquerda), porém move-se para o plano do heme durante a oxigenação (à direita).

O átomo de ferro situa-se no centro da protoporfirina, ligado aos quatro átomos de nitrogênio pirrólicos. Embora o ferro ligado ao heme possa estar no estado de oxidação ferroso (Fe^{2+}) ou férrico (Fe^{3+}), apenas o estado Fe^{2+} é capaz de se ligar ao oxigênio. O íon ferro pode formar duas ligações adicionais, uma em cada lado do plano do heme. Esses sítios de ligação são denominados quinto e sexto sítios de coordenação. Na mioglobina, o quinto sítio de coordenação é ocupado pelo anel imidazol de um resíduo de histidina da proteína. Essa histidina é designada como *histidina proximal*.

A ligação do oxigênio ocorre no sexto sítio de coordenação. Na desoxi-hemoglobina, esse sítio permanece desocupado. O íon ferro é muito volumoso para se encaixar no orifício bem definido dentro do anel de porfirina; ele se localiza aproximadamente 0,4 Å fora do plano da porfirina (Figura 7.2, à esquerda). A ligação da molécula de oxigênio ao sexto sítio de coordenação induz um rearranjo substancial dos elétrons no ferro, de modo que o íon torna-se efetivamente menor, o que possibilita o seu movimento dentro do plano da porfirina (Figura 7.2, à direita). As mudanças de estrutura que ocorrem com a ligação do oxigênio foram notavelmente previstas por Linus Pauling, com base em medidas magnéticas realizadas em 1936, quase 25 anos antes da elucidação das estruturas tridimensionais da mioglobina e da hemoglobina.

As mudanças que ocorrem na estrutura eletrônica do heme com a ligação do oxigênio constituem a base dos exames de imagens funcionais

A mudança na estrutura eletrônica que ocorre quando o íon ferro se move dentro do plano da porfirina é acompanhada de alterações nas propriedades magnéticas da hemoglobina; essas mudanças constituem a base da *ressonância magnética funcional* (RMf), um dos métodos mais poderosos para examinar a função cerebral. As técnicas de ressonância magnética nuclear detectam sinais que se originam principalmente dos prótons nas moléculas de água e que são alterados pelas propriedades magnéticas da hemoglobina. Com o uso de técnicas apropriadas, imagens podem ser geradas para revelar diferenças nas quantidades relativas de desoxi e oxi-hemoglobina e, portanto, na atividade relativa de várias partes do cérebro. Quando uma parte específica do cérebro está ativa, os vasos sanguíneos relaxam para possibilitar um fluxo maior de sangue para essa região. Por conseguinte, uma região mais ativa do cérebro será mais rica em oxi-hemoglobina.

Esses métodos não invasivos identificam áreas do cérebro que processam informações sensoriais. Por exemplo, indivíduos foram submetidos a exames de imagem enquanto estavam respirando ar contendo ou não substâncias odoríferas. Na presença de substâncias odoríferas, a RMf detecta aumento no nível de oxigenação da hemoglobina (e, portanto, de atividade) em várias regiões do cérebro (Figura 7.3). Essas regiões estão no córtex olfatório primário, bem como em áreas onde presumivelmente ocorre o processamento secundário de sinais olfatórios. Uma análise mais detalhada revela a cinética de ativação de determinadas regiões. A RM funcional tem um enorme potencial para o mapeamento de regiões e vias envolvidas no processamento das informações sensoriais obtidas de todos os órgãos dos sentidos. Assim, um aspecto aparentemente incidental da bioquímica da hemoglobina possibilitou a observação do cérebro em ação.

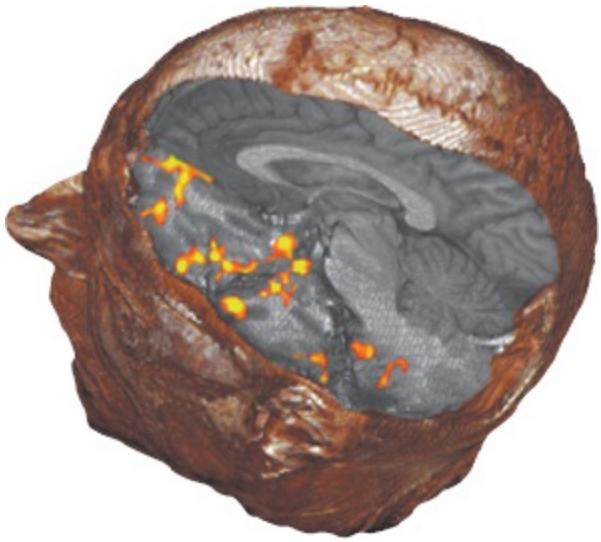


Figura 7.3 Imagem do cérebro por ressonância magnética funcional. Uma imagem por ressonância magnética funcional revela a resposta do cérebro a substâncias odoríferas. [De N. Sobel *et al., J. Neurophysiol.* 83(2000):537-551; cortesia do Dr. Noam Sobel.]

A estrutura da mioglobina impede a liberação de espécies reativas de oxigênio

A ligação do oxigênio ao ferro no heme é acompanhada da transferência parcial de um elétron do íon ferroso para o oxigênio. Em muitas maneiras, a estrutura é mais bem descrita como um complexo entre o íon férrico (Fe^{3+}) e o *ânion superóxido* (O_2^-), conforme ilustrado na Figura 7.4. é crucial que

o oxigênio, quando liberado, esteja na forma de dioxigênio, e não de superóxido, por duas razões importantes. Em primeiro lugar, o superóxido e outras formas geradas a partir dele são espécies reativas de oxigênio, que podem danificar muitos materiais biológicos. Em segundo lugar, a liberação de superóxido deixa o íon ferro no estado férrico. Essa espécie, denominada *metamioglobina*, não se liga ao oxigênio. Por conseguinte, há perda da capacidade de armazenamento potencial de oxigênio. As características da mioglobina estabilizam o complexo de oxigênio, de tal modo que o superóxido tem menos probabilidade de ser liberado. Em particular, a bolsa de ligação da mioglobina inclui um resíduo de histidina adicional (denominado *histidina distal*), que doa uma ponte de hidrogênio à molécula de oxigênio ligada (Figura 7.5). O caráter de superóxido do oxigênio ligado fortalece essa interação. Por conseguinte, *a proteína componente da mioglobina controla a reatividade intrínseca do heme*, tornando-o mais apropriado para ligação reversível ao oxigênio.

Figura 7.4 Ligação do ferro-oxigênio. A interação entre o ferro e o oxigênio na mioglobina pode ser descrita como uma combinação de estruturas de ressonância, uma com Fe^{2+} e dioxigênio e a outra com Fe^{3+} e íon superóxido.

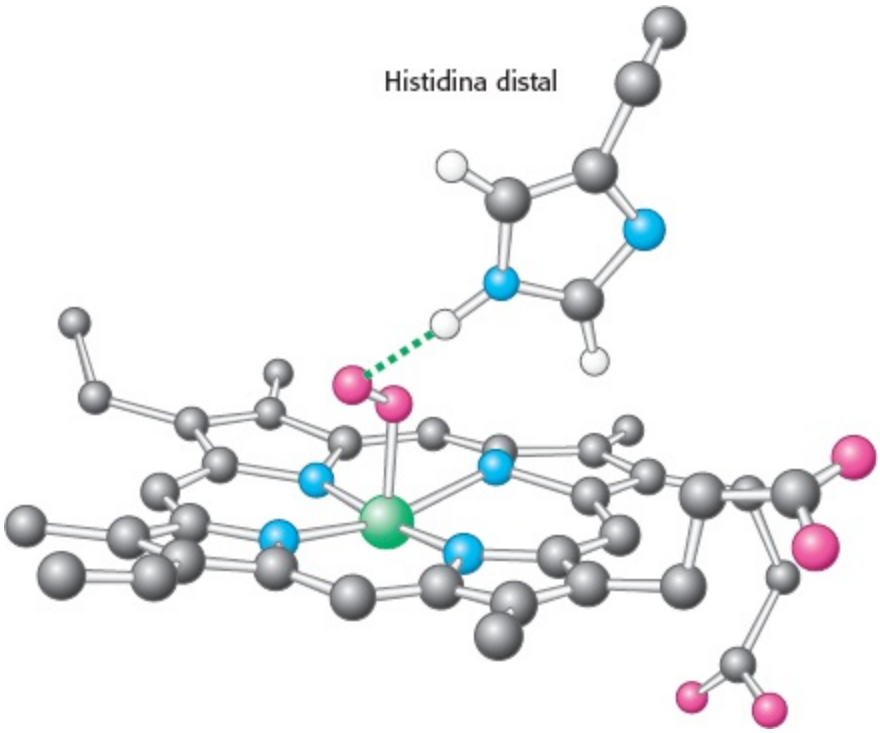


Figura 7.5 Estabilização do oxigênio ligado. Uma ponte de hidrogênio (linha verde pontilhada) doada pelo resíduo de histidina distal à molécula do oxigênio ligada ajuda a estabilizar a oximioglobina.

A hemoglobina humana é uma montagem de quatro subunidades semelhantes à mioglobina

A estrutura tridimensional da hemoglobina do coração de cavalo foi elucidada por Max Perutz, pouco depois da determinação da estrutura da mioglobina. Desde então, as estruturas das hemoglobinas de outras espécies, incluindo os seres humanos, foram determinadas. A hemoglobina é constituída de quatro cadeias polipeptídicas, duas *cadeias* α idênticas e duas *cadeias* β idênticas (Figura 7.6). Cada

uma das subunidades compreende um conjunto de α–hélices no mesmo arranjo que as α–hélices da mioglobina (ver na Figura 6.15 uma comparação das estruturas). A estrutura recorrente é denominada *enovelamento do tipo globina*. De acordo com essa semelhança estrutural, o alinhamento das sequências de aminoácidos das cadeias α e β da hemoglobina humana com as da mioglobina do cachalote proporciona uma identidade de 25 e 24%, respectivamente, com uma boa conservação de resíduos essenciais, como as histidinas proximal e distal. Por conseguinte, as cadeias α e β estão relacionadas entre si e com a mioglobina por evolução divergente (Seção 6.2).

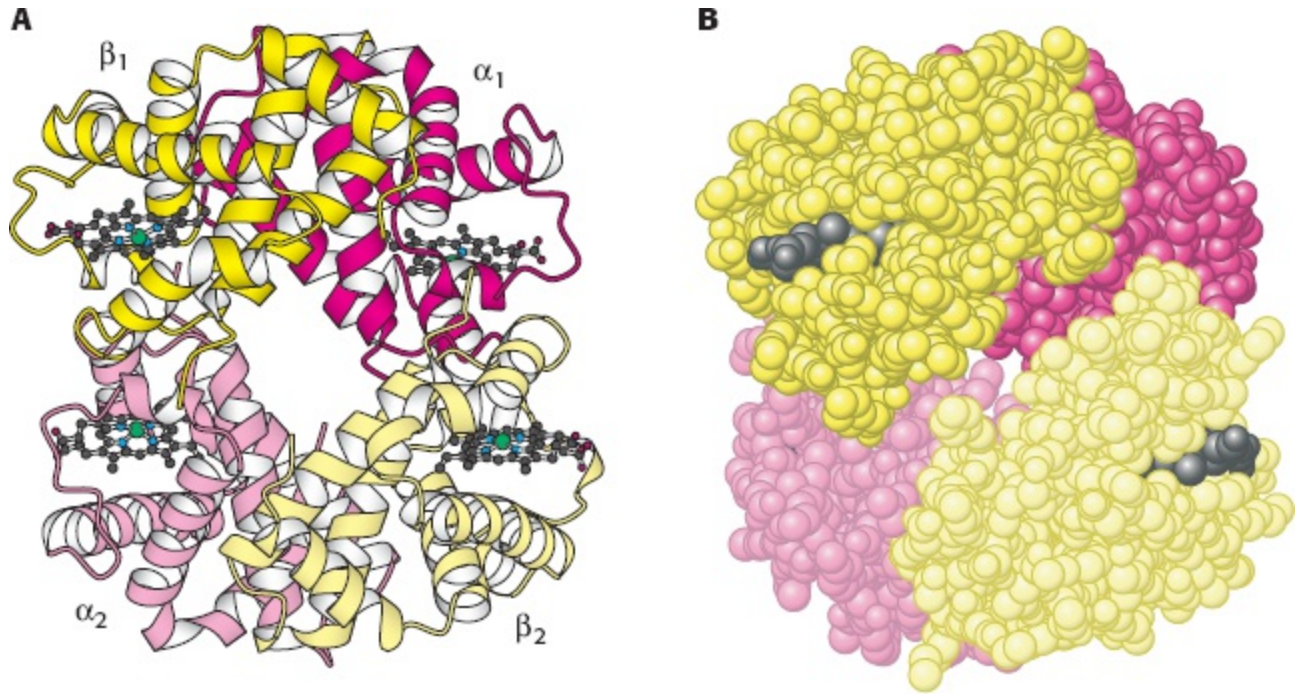


Figura 7.6 Estrutura quaternária da desoxi-hemoglobina. A hemoglobina, que é composta de duas cadeias α e duas cadeias β, funciona como um par de dímeros αβ. **A.** Diagrama em fita. **B.** Modelo de preenchimento espacial. [Desenhada a partir de 1A3N.pdb.]

O tetrâmero de hemoglobina, denominado *hemoglobina A* (HbA), é mais bem descrito como um par de *dímeros* αβ idênticos ($\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$), que se associam para formar o tetrâmero. Na desoxi-hemoglobina, esses dímeros αβ estão ligados por uma extensa interface, que inclui a extremidade carboxiterminal de cada cadeia. Os grupos heme estão bem separados no tetrâmero por distâncias de ferro-ferro que variam de 20 a 40 Å.

7.2 A hemoglobina liga-se ao oxigênio de modo cooperativo

Podemos determinar as propriedades de ligação ao oxigênio de cada uma dessas proteínas observando a sua *curva de ligação ao oxigênio,* um traçado da *fração de saturação versus* a concentração de oxigênio. A fração de saturação, *Y*, é definida como a fração de possíveis sítios de ligação que contêm oxigênio ligado. O valor de *Y* pode variar de 0 (todos os sítios vazios) a 1 (todos os sítios ocupados). A concentração de oxigênio é mais convenientemente medida pela sua *pressão parcial,* pO_2. Para a mioglobina, obtém-se uma curva de ligação indicando um equilíbrio químico simples (Figura 7.7). Observe que a curva eleva-se acentuadamente à medida que aumenta a pO_2 e, em seguida, se nivela. A meia saturação dos sítios de ligação, designada como P_{50} (saturação de

50%), situa-se no valor relativamente baixo de 2 torr (mmHg), indicando que o oxigênio se liga à mioglobina com alta afinidade.

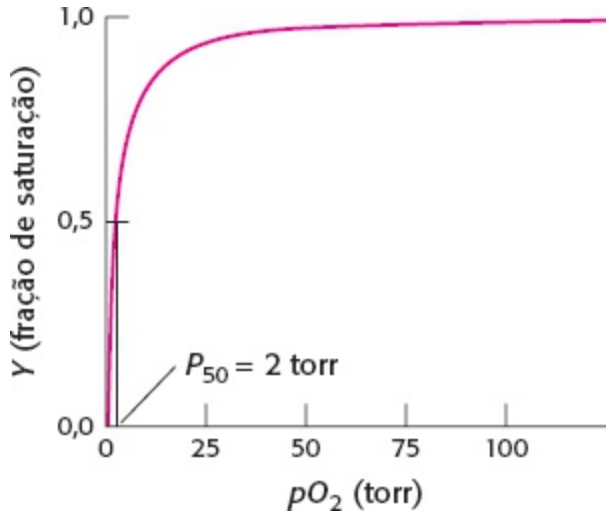


Figura 7.7 Ligação do oxigênio à mioglobina. Metade das moléculas de mioglobina liga-se ao oxigênio quando a pressão parcial do oxigênio é de 2 torr.

Torr
Uma unidade de pressão igual àquela exercida por uma coluna de mercúrio de 1 mm de altura a 0°C e gravidade padrão (1 mmHg). Assim designada em homenagem a Evangelista Torricelli (1608-1647), o inventor do barômetro de mercúrio.

Em contrapartida, a curva de ligação ao oxigênio para a hemoglobina nos eritrócitos exibe algumas características notáveis (Figura 7.8). Ela não parece uma curva de ligação simples, como a da mioglobina; em vez disso, assemelha-se a um "S". Essas curvas são denominadas *sigmoides,* em virtude de sua forma semelhante a um S. Além disso, a ligação do oxigênio à hemoglobina (P_{50} = 26 torr) é significativamente mais fraca que a da mioglobina. Observe que essa curva de ligação é obtida da hemoglobina nos eritrócitos. Dentro dos eritrócitos, a hemoglobina interage com o 2,3-bifosfoglicerato, uma molécula que diminui significativamente a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, como iremos considerar detalhadamente adiante.

Uma curva de ligação sigmoide indica que a proteína exibe um comportamento de ligação especial. No caso da hemoglobina, essa forma sugere que a ligação do oxigênio a um sítio dentro do tetrâmero de hemoglobina aumenta a probabilidade de ligação do oxigênio aos sítios desocupados remanescentes. Por outro lado, a liberação de oxigênio de um heme facilita a saída de oxigênio dos outros. Esse tipo de comportamento de ligação é denominado *cooperativo*, visto que as reações de ligação nos sítios individuais de cada molécula de hemoglobina não são independentes umas das outras. Mais adiante, retornaremos ao mecanismo dessa cooperatividade.

Qual é o significado fisiológico da ligação cooperativa do oxigênio pela hemoglobina? O oxigênio precisa ser transportado no sangue dos pulmões, onde a pressão parcial de oxigênio é relativamente alta (aproximadamente 100 torr), para os tecidos com metabolismo ativo, onde a pressão parcial de oxigênio é muito mais baixa (tipicamente de 20 torr). Consideremos como o comportamento cooperativo indicado pela curva sigmoide promove o transporte eficiente de oxigênio (Figura 7.9). Nos pulmões, a hemoglobina torna-se quase saturada de oxigênio, com ocupação de 98% dos sítios de ligação de oxigênio. Quando a hemoglobina se move para os tecidos e libera O_2, o nível de

saturação cai para 32%. Por conseguinte, 98 – 32 = 66% dos sítios potenciais de ligação de oxigênio contribui para o transporte de oxigênio. A liberação cooperativa do oxigênio favorece uma descarga mais completa de oxigênio nos tecidos. Se a mioglobina fosse empregada para o transporte de oxigênio, ela estaria 98% saturada nos pulmões, porém permaneceria 91% saturada nos tecidos, de modo que apenas 98 – 91 = 7% dos sítios contribuiriam para o transporte de oxigênio. A mioglobina liga-se ao oxigênio demasiadamente firme para ser útil no seu transporte. A situação poderia ter sido melhorada sem cooperatividade pelo desenvolvimento de um carreador não cooperativo de oxigênio com afinidade otimizada pelo oxigênio. Para esse tipo de proteína, a quantidade máxima de oxigênio que poderia ser transportada de uma região em que a pO_2 é de 100 torr para outra região em que pO_2 é de 20 torr é 63 – 25 = 38%. Por conseguinte, a ligação cooperativa e a liberação de oxigênio pela hemoglobina fazem com que ela libere quase 10 vezes mais oxigênio do que a mioglobina e mais de 1,7 vez o que poderia ser liberado por qualquer proteína não cooperativa.

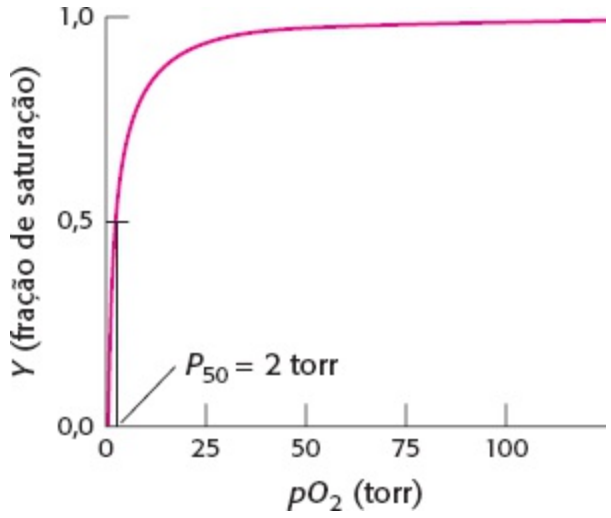


Figura 7.8 Ligação do oxigênio à hemoglobina. Esta curva, obtida para a hemoglobina nos eritrócitos, tem uma forma ligeiramente semelhante a um "S", indicando a presença de sítios de ligação de oxigênio distintos, mas que interagem, em cada molécula de hemoglobina. A meia saturação para a hemoglobina é de 26 torr. Para comparação, a curva de ligação da mioglobina é mostrada como curva tracejada em preto.

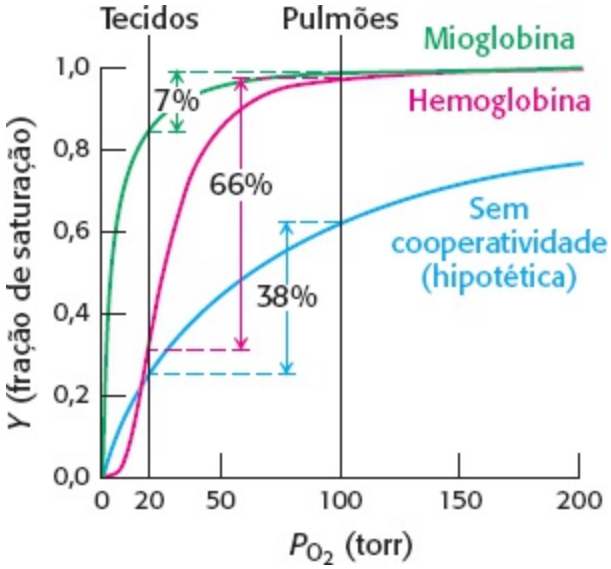


Figura 7.9 A cooperatividade aumenta a liberação de oxigênio pela hemoglobina. Em virtude da cooperatividade entre os sítios de ligação de O_2, a hemoglobina libera mais O_2 aos tecidos do que faria a mioglobina ou qualquer proteína não cooperativa, mesmo uma proteína com afinidade ótima pelo O_2.

Um exame mais atento das concentrações de oxigênio nos tecidos em repouso e durante o exercício ressalta a eficiência da hemoglobina como carreadora de oxigênio (Figura 7.10). Em condições de repouso, a concentração de oxigênio no músculo é de aproximadamente 40 torr; entretanto, durante o exercício, a concentração é reduzida para 20 torr. Na diminuição de 100 torr nos pulmões para 40 torr no músculo em repouso, a saturação de oxigênio da hemoglobina é reduzida de 98 para 77%, de modo que 98 – 77 = 21% do oxigênio são liberados com um declínio de 60 torr. Em um declínio de 40 torr para 20 torr, a saturação de oxigênio é reduzida de 77 para 32%, correspondendo a uma liberação de oxigênio de 45% com uma queda de 20 torr. Por conseguinte, como a mudança na concentração de oxigênio do estado de repouso para o exercício corresponde à parte mais inclinada da curva de ligação de oxigênio, o oxigênio é liberado efetivamente para os tecidos onde ele é mais necessário. Na Seção 7.3, examinaremos outras propriedades da hemoglobina que aumentam a sua responsividade fisiológica.

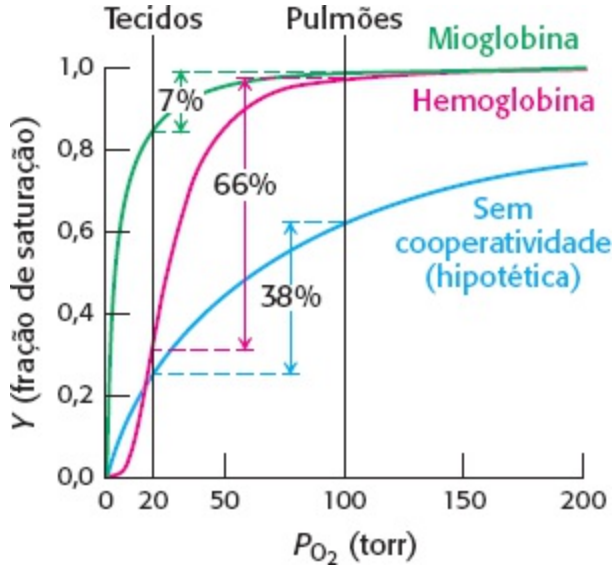


Figura 7.10 Resposta ao exercício. A queda na concentração de oxigênio de 40 torr nos tecidos em repouso para 20 torr nos tecidos em exercício ativo corresponde à parte mais inclinada da curva de ligação de oxigênio. Conforme mostrado aqui, a hemoglobina é muito efetiva no suprimento de oxigênio aos tecidos ativos.

A ligação do oxigênio modifica acentuadamente a estrutura quaternária da hemoglobina

A ligação cooperativa do oxigênio pela hemoglobina requer que a ligação do oxigênio em um sítio no tetrâmero de hemoglobina influencie as propriedades de ligação de oxigênio nos outros sítios. Tendo em vista a grande separação existente entre os locais de ferro, não é possível haver interações diretas. Por conseguinte, são necessários mecanismos indiretos para acoplar os sítios. Esses mecanismos estão intimamente relacionados com a estrutura quaternária da hemoglobina.

A hemoglobina sofre mudanças substanciais na sua estrutura quaternária com a ligação do oxigênio: os dímeros $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$ sofrem uma rotação de aproximadamente 15° um em relação ao outro (Figura 7.11). Os próprios dímeros permanecem relativamente inalterados, embora ocorram deslocamentos localizados de conformação. Assim, a interface entre os dímeros $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$ é mais afetada por essa transição estrutural. Em particular, os dímeros $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$ ficam mais livres para se mover um em relação ao outro no estado oxigenado do que no estado desoxigenado.

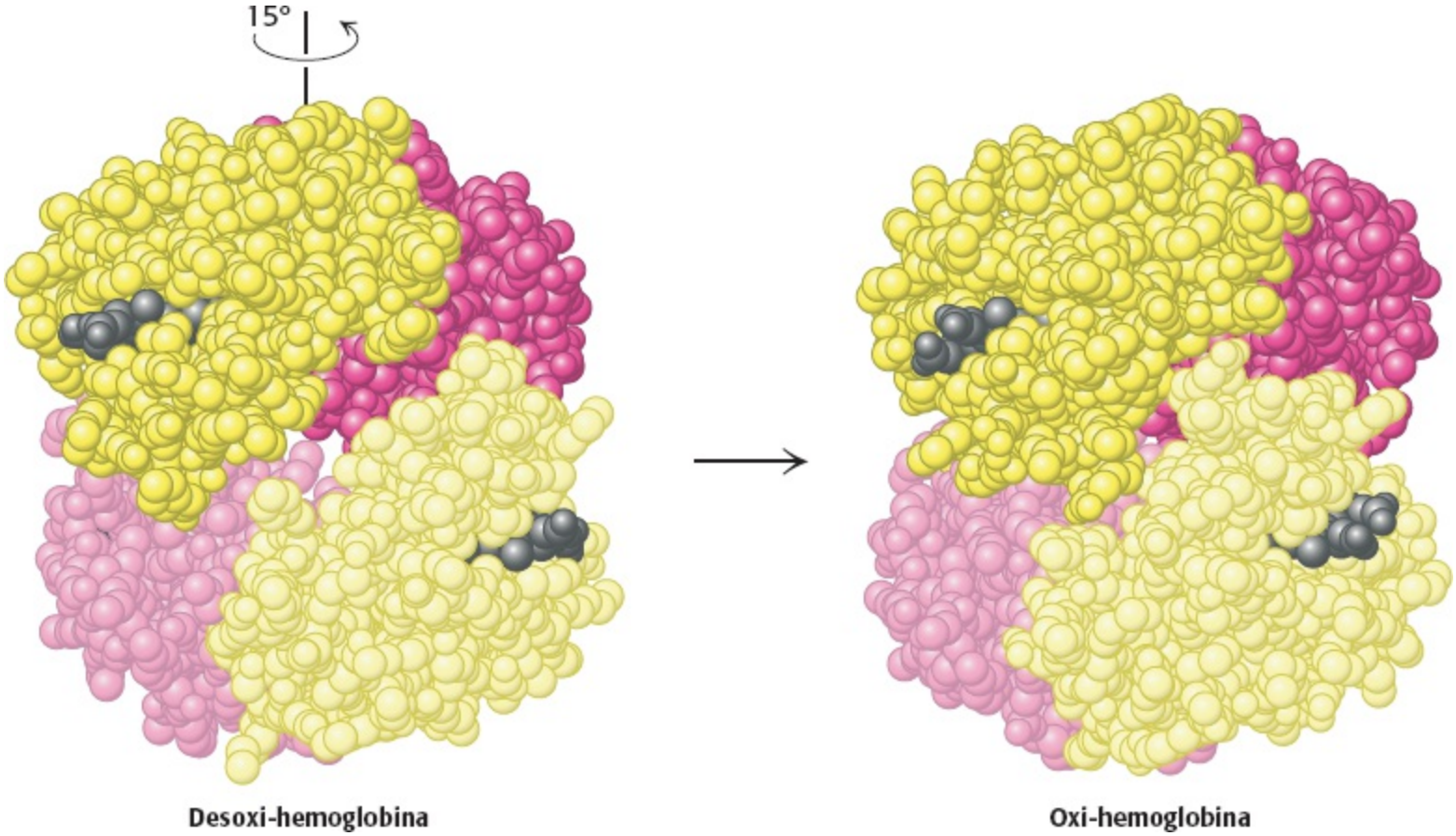


Figura 7.11 Mudanças da estrutura quaternária com a ligação do oxigênio à hemoglobina. *Observe* que, com a oxigenação, um dímero αβ desloca-se em relação ao outro por uma rotação de 15°. [Desenhada a partir de 1A3N.pdb e 1LFQ.pdb.]

A estrutura quaternária observada na forma desoxi da hemoglobina, a *desoxi-hemoglobina,* é frequentemente designada como *estado T* (de tenso), visto que está muito restringida pelas interações entre as subunidades. A estrutura quaternária da forma totalmente oxigenada, a *oxi-hemoglobina*, é designada como *estado R* (de relaxado). Considerando que a forma R da hemoglobina é menos restrita, as designações "tensa" e "relaxada" parecem ser particularmente apropriadas. É importante ressaltar que, no estado R, os sítios de ligação de oxigênio estão livres de restrição e são capazes de ligar-se ao oxigênio com maior afinidade do que os sítios no estado T. *Ao desencadear a mudança do tetrâmero de hemoglobina do estado T para o estado R, a ligação de oxigênio a um sítio aumenta a afinidade de ligação dos outros sítios.*

A cooperatividade da hemoglobina pode ser potencialmente explicada por vários modelos

Foram desenvolvidos dois modelos limitantes para explicar a ligação cooperativa de ligantes a uma montagem de múltiplas subunidades, como a hemoglobina. No *modelo concertado (ou coordenado)*, também conhecido como *modelo MWC* em homenagem a Jacques Monod, Jeffries Wyman e Jean-Pierre Changeux, que foram os primeiros a propô-lo, a montagem global só pode existir em duas formas: no estado T e no estado R. A ligação de ligantes simplesmente desloca o equilíbrio entre esses dois estados (Figura 7.12). Por conseguinte, à medida que o tetrâmero de hemoglobina se liga a cada molécula de oxigênio, aumenta a probabilidade de que o tetrâmero esteja no estado R. Os tetrâmeros de desoxi-hemoglobina estão quase exclusivamente no estado T. Entretanto, a ligação de

oxigênio a um sítio na molécula desloca o equilíbrio para o estado R. Se uma molécula adotar a estrutura quaternária R, a afinidade de seus sítios pelo oxigênio aumentará. Neste momento, moléculas adicionais de oxigênio têm mais probabilidade de se ligarem aos três sítios desocupados. Por conseguinte, a curva de ligação tem uma inclinação pequena na presença de baixas concentrações de oxigênio, quando todas as moléculas estão no estado T, porém torna-se mais inclinada à medida que aumenta a fração de moléculas no estado R e novamente se achata quando todos os sítios nas moléculas no estado R ficam preenchidas (Figura 7.13). Esses eventos produzem a curva de ligação sigmoide tão importante para o transporte eficiente de oxigênio.

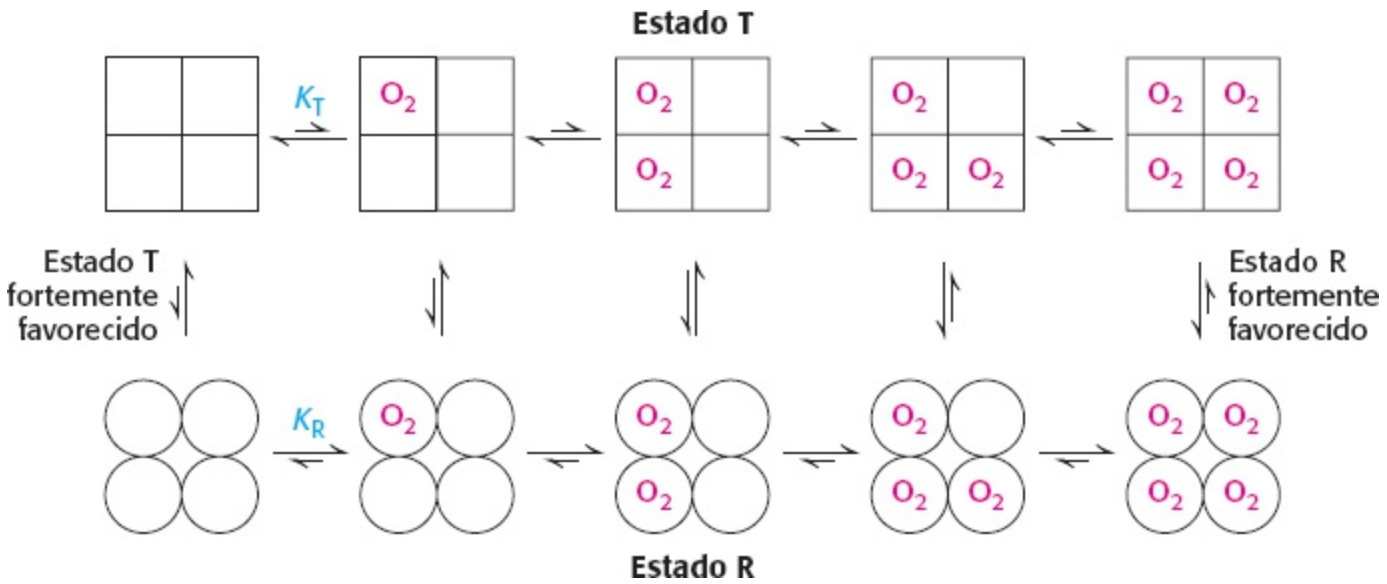


Figura 7.12 Modelo concertado. Todas as moléculas existem no estado T ou no estado R. Em cada nível de carga de oxigênio, existe um equilíbrio entre os estados T e R. O equilíbrio desloca-se do estado T fortemente favorecido sem oxigênio ligado para o estado R fortemente favorecido quando a molécula está totalmente carregada de oxigênio. O estado R tem maior afinidade pelo oxigênio do que o estado T.

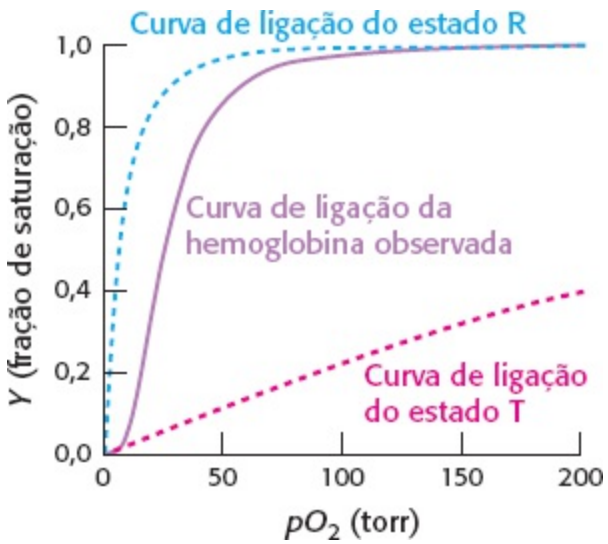


Figura 7.13 Transição de T para R. A curva de ligação observada para a hemoglobina pode ser vista como uma combinação das curvas de ligação que seriam observadas se todas as moléculas permanecessem no estado T, ou se todas estivessem no estado R. A curva sigmoide é observada porque as moléculas passam do estado T para o estado R com a ligação das moléculas de oxigênio.

No modelo concertado, cada tetrâmero pode existir em apenas dois estados: o estado T o estado R. Em um modelo alternativo, o *modelo sequencial*, a ligação de um ligante a um sítio em uma

montagem aumenta a afinidade de ligação dos sítios vizinhos, sem induzir uma conversão total do estado T no estado R (Figura 7.14).

A ligação cooperativa de oxigênio pela hemoglobina é mais bem descrita pelo modelo concertado ou pelo modelo sequencial? Nenhum dos modelos em sua forma pura explica por completo o comportamento da hemoglobina. Na verdade, é necessário um modelo combinado. O comportamento da hemoglobina é *concertado* pelo fato de que o tetrâmero com três sítios ocupados pelo oxigênio está quase sempre na estrutura quaternária associada ao estado R. O sítio de ligação remanescente aberto tem uma afinidade pelo oxigênio mais de 20 vezes maior que a ligação da hemoglobina totalmente desoxigenada a seu primeiro oxigênio. Todavia, o comportamento não é totalmente concertado, visto que a hemoglobina com oxigênio ligado a apenas um dos quatro sítios permanece primariamente na estrutura quaternária no estado T. Entretanto, essa molécula liga-se ao oxigênio três vezes mais fortemente do que a hemoglobina totalmente desoxigenada, uma observação compatível apenas com um modelo sequencial. Esses resultados destacam o fato que os modelos coordenado e sequencial representam casos limitantes idealizados, dos quais os sistemas reais podem se aproximar, mas raramente alcançá-los.

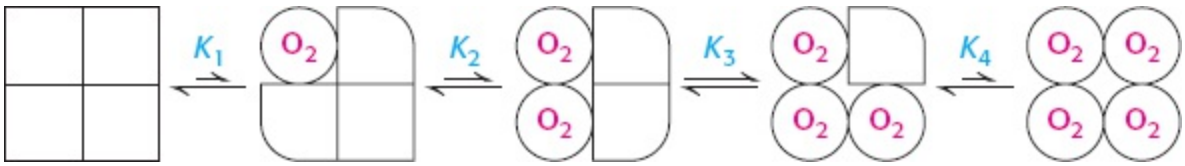


Figura 7.14 Modelo sequencial. A ligação de um ligante modifica a conformação da subunidade à qual se liga. Essa mudança conformacional induz alterações nas subunidades vizinhas, aumentando a sua afinidade pelo ligante.

As mudanças estruturais nos grupos heme são transmitidas à interface $\alpha_1\beta_1$–$\alpha_2\beta_2$

Examinemos agora como a ligação do oxigênio a um sítio é capaz de deslocar o equilíbrio entre os estados T e R de todo o tetrâmero de hemoglobina. À semelhança da mioglobina, a ligação do oxigênio faz com que cada átomo de ferro na hemoglobina se mova de fora do plano da porfirina para dentro dele. Quando o átomo de ferro se move, o resíduo de histidina ligado no quinto sítio de coordenação o acompanha. Esse resíduo de histidina faz parte de uma α–hélice, que também se move (Figura 7.15). A extremidade carboxiterminal dessa α-hélice situa-se na interface entre os dois dímeros αβ. A mudança na posição da extremidade carboxiterminal da hélice favorece a transição do estado T para R. Consequentemente, *a transição estrutural do íon de ferro em uma subunidade é diretamente transmitida para as outras subunidades.* O rearranjo da interface do dímero fornece uma via para a comunicação entre as subunidades, possibilitando a ligação cooperativa do oxigênio.

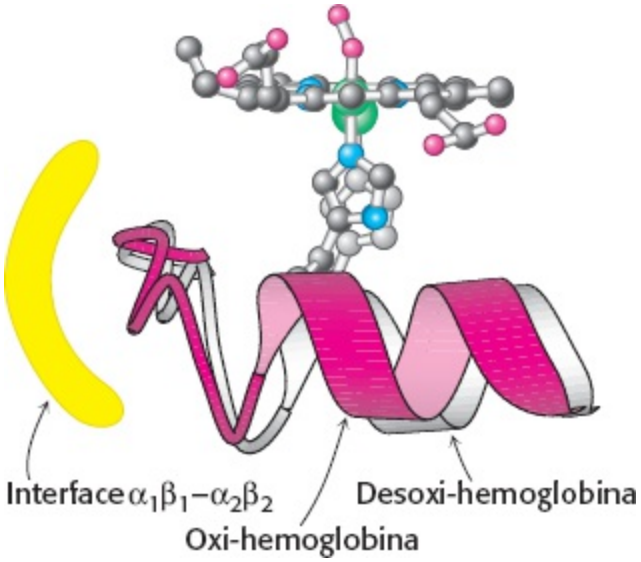
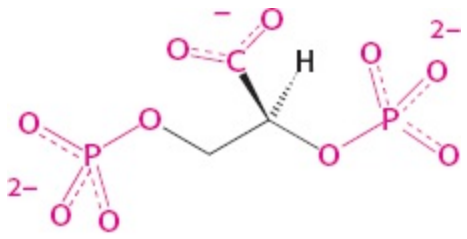


Figura 7.15 Mudanças conformacionais na hemoglobina. O movimento do íon ferro com a oxigenação leva o resíduo de histidina associada ao ferro para o anel de porfirina. O movimento associado da α–hélice contendo histidina altera a interface entre os dímeros αβ, induzindo outras mudanças estruturais. Para comparação, a estrutura da desoxi-hemoglobina é mostrada em cinza, atrás da estrutura da oxi-hemoglobina colorida.

O 2,3-bifosfoglicerato nos eritrócitos é crucial na determinação da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio

Para que a hemoglobina possa funcionar de modo eficiente, o estado T precisa permanecer estável até que a ligação de oxigênio suficiente o tenha convertido no estado R. Todavia, o estado T da hemoglobina é, de fato, altamente instável, deslocando o equilíbrio tanto para o estado R que pouco oxigênio seria liberado em condições fisiológicas. Por conseguinte, é necessário um mecanismo adicional para estabilizar adequadamente o estado T. Esse mecanismo foi descoberto quanto da comparação das propriedades de ligação de oxigênio da hemoglobina nos eritrócitos com a hemoglobina totalmente purificada (Figura 7.16). A hemoglobina pura liga-se ao oxigênio muito mais firmemente do que a hemoglobina nos eritrócitos. Essa acentuada diferença deve-se à presença, dentro dessas células, de *2,3-bifosfoglicerato* (2,3-BPG; também conhecido como 2,3-difosfoglicerato ou 2,3-DPG).



2,3-bifosfoglicerato
(2,3-BPG)

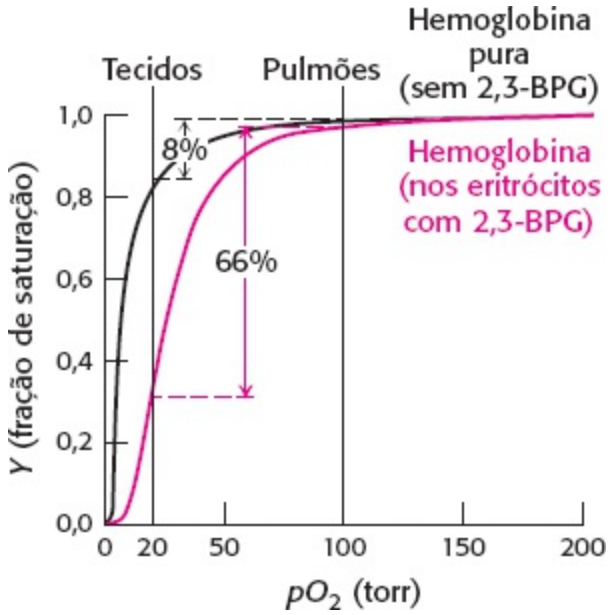


Figura 7.16 Ligação do oxigênio à hemoglobina pura em comparação com a hemoglobina dentro dos eritrócitos. A hemoglobina pura liga-se ao oxigênio mais firmemente do que a hemoglobina dentro dos eritrócitos. Essa diferença deve-se à presença de 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG) nos eritrócitos.

Esse composto altamente aniônico está presente nos eritrócitos aproximadamente na mesma concentração que a hemoglobina (~2 mM). Na ausência de 2,3-BPG, a hemoglobina seria um transportador de oxigênio extremamente ineficiente, liberando apenas 8% de sua carga nos tecidos.

Como o 2,3-BPG diminui tão significativamente a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio? O exame da estrutura cristalográfica da desoxi-hemoglobina na presença de 2,3-BPG revela que uma única molécula 2,3-BPG se liga ao centro do tetrâmero, em uma bolsa presente apenas na forma T (Figura 7.17). Durante a transição do estado T para R, essa bolsa colapsa, e o 2,3-BPG é liberado. Por conseguinte, para que ocorra a transição estrutural do estado T para R, as ligações entre a hemoglobina e o 2,3-BPG precisam ser rompidas. Na presença de 2,3-BPG, mais sítios de ligação ao oxigênio dentro do tetrâmero de hemoglobina precisam ser ocupados para induzir a transição de T para R, de modo que a hemoglobina permanece no estado T de menor afinidade até que sejam alcançadas concentrações mais altas de oxigênio. Esse mecanismo de regulação é notável, visto que o 2,3-BPG não se assemelha de modo algum ao oxigênio, a molécula por meio da qual a hemoglobina desempenha a sua principal função. O 2,3-BPG é designado como *efetor alostérico* (do grego *allos*, "outra", e *stereos*, "estrutura"). A regulação por uma molécula estruturalmente não relacionada com o oxigênio é possível, visto que o efetor alostérico se liga a um sítio totalmente distinto daquele do oxigênio. Encontraremos novamente os efeitos alostéricos quando considerarmos a regulação enzimática no Capítulo 10.

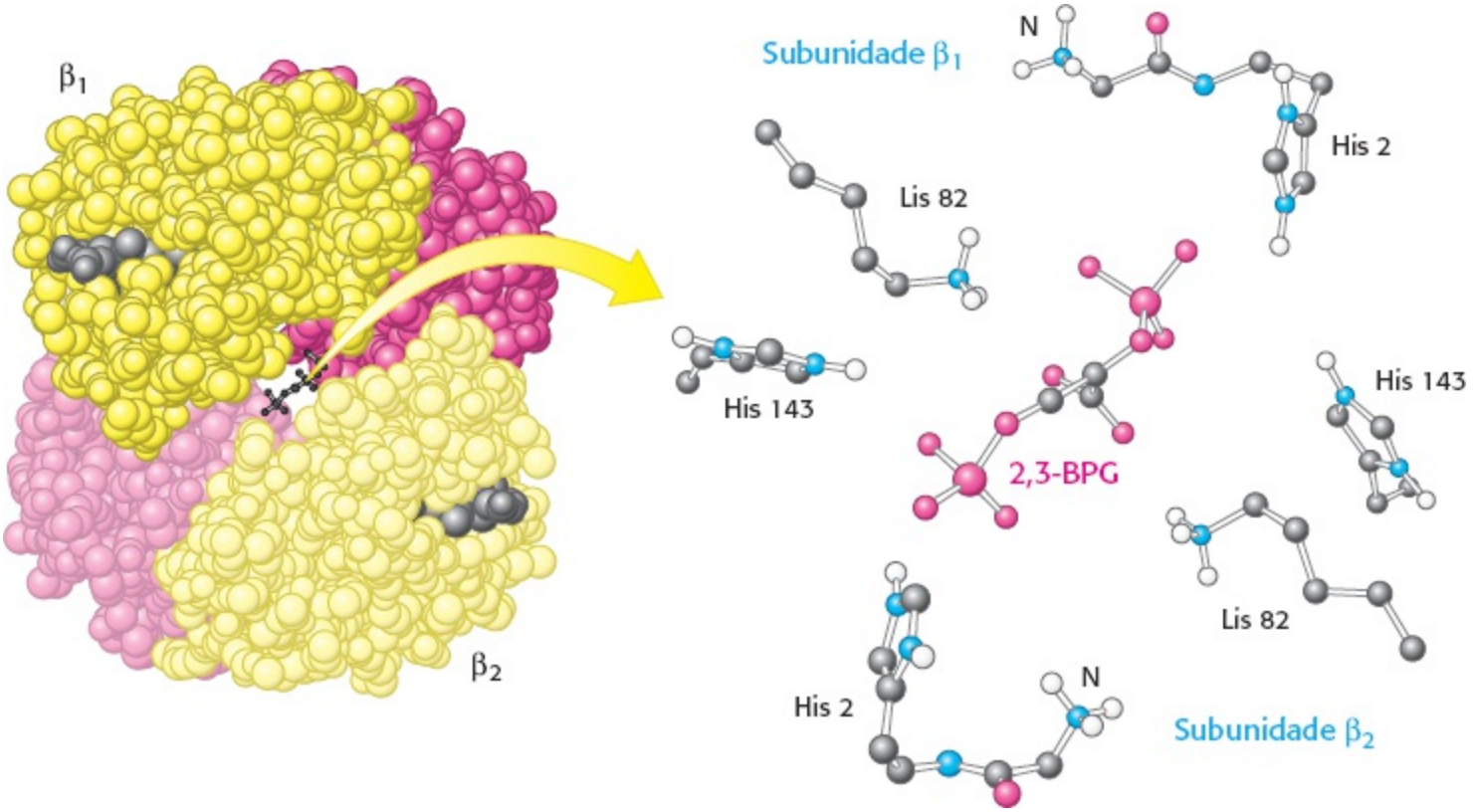


Figura 7.17 Modo de ligação do 2,3-BPG à desoxi-hemoglobina humana. O 2,3-bifosfoglicerato liga-se à cavidade central da desoxi-hemoglobina (à esquerda). Nesse local, interage com três grupos de carga positiva em cada cadeia β (à direita). [Desenhada a partir de 1B86.pdb.]

A ligação do 2,3-BPG à hemoglobina tem outras consequências fisiológicas cruciais. O gene da globina expresso pelos fetos humanos difere daquele expresso pelos adultos; os tetrâmeros de *hemoglobina fetal* incluem duas cadeias α e duas cadeias γ. A cadeia γ, um resultado de uma duplicação gênica, é 72% idêntica à cadeia β na sua sequência de aminoácidos. Uma mudança notável é a substituição da His 143 por uma serina na cadeia β, parte do sítio de ligação do 2,3-BPG. Essa mudança remove duas cargas positivas do sítio de ligação do 2,3-BPG (um de cada cadeia) e diminui a afinidade do 2,3-BPG pela hemoglobina fetal. Consequentemente, a afinidade da hemoglobina fetal pelo oxigênio é maior que a da hemoglobina materna (adulta) (Figura 7.18). Essa diferença de afinidade pelo oxigênio possibilita a transferência efetiva de oxigênio dos eritrócitos maternos para os fetais. Temos aqui um exemplo em que a duplicação gênica e a especialização produziram uma rápida solução a um desafio biológico – neste caso, o transporte de oxigênio da mãe para o feto.

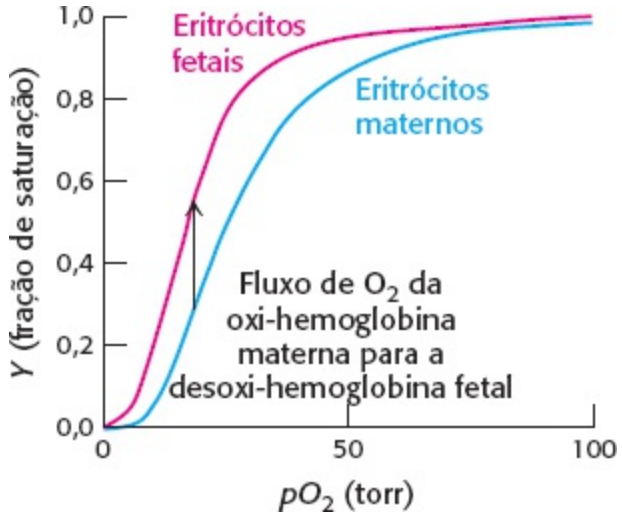


Figura 7.18 Afinidade dos eritrócitos fetais pelo oxigênio. Os eritrócitos fetais exibem maior afinidade pelo oxigênio do que os eritrócitos maternos, visto que a hemoglobina fetal não se liga ao 2,3-BPG tão bem quanto a hemoglobina materna.

O monóxido de carbono pode interromper o transporte de oxigênio pela hemoglobina

O *monóxido de carbono* (CO) é um gás incolor e inodoro, que se liga à hemoglobina no mesmo sítio que o oxigênio, formando um complexo denominado *carboxi-hemoglobina*. A formação de carboxi-hemoglobina exerce efeitos devastadores sobre o transporte normal de oxigênio de duas maneiras. Em primeiro lugar, o monóxido de carbono liga-se à hemoglobina cerca de 200 vezes mais fortemente do que o oxigênio. Mesmo na presença de baixas pressões parciais no sangue, o monóxido de carbono deslocará o oxigênio da hemoglobina, impedindo a sua liberação. Em segundo lugar, o monóxido de carbono ligado a um sítio na hemoglobina desloca a curva de saturação de oxigênio dos sítios remanescentes para a esquerda, forçando o tetrâmero a assumir o estado R. Isso resulta em aumento da afinidade pelo oxigênio, impedindo a sua dissociação nos tecidos.

A exposição ao monóxido de carbono – de aparelhos a gás e de automóveis, por exemplo – pode causar envenenamento; o paciente apresenta náuseas, vômitos, letargia, fraqueza e desorientação. Um tratamento para o envenenamento por monóxido de carbono consiste na administração de oxigênio a 100%, frequentemente em pressões maiores que a pressão atmosférica (esse tratamento é conhecido como *oxigenoterapia hiperbárica*). Com esse tratamento, a pressão parcial de oxigênio no sangue torna-se alta o suficiente para aumentar substancialmente a taxa de deslocamento de monóxido de carbono da hemoglobina. Entretanto, a exposição a altas concentrações de monóxido de carbono pode ser rapidamente fatal: nos EUA, cerca de 2.500 pessoas morrem a cada ano de envenenamento por monóxido de carbono, das quais cerca de 500 por exposições acidentais e quase 2.000 por suicídio.

7.3 Os íons hidrogênio e o dióxido de carbono promovem a liberação de oxigênio | O efeito Bohr

Vimos como a liberação cooperativa de oxigênio da hemoglobina ajuda a liberar o oxigênio aos tecidos onde ele é mais necessário, conforme revelado pelas suas baixas pressões parciais de oxigênio. Essa capacidade é acentuada pela facilidade da hemoglobina de responder a outros sinais existentes no seu ambiente fisiológico, que indicam a necessidade de oxigênio. Os tecidos de

metabolismo rápido, como os músculos em contração, geram grandes quantidades de íons hidrogênio e dióxido de carbono (Capítulo 16). Para liberar o oxigênio onde a sua necessidade é maior, a hemoglobina evoluiu para responder a níveis mais altos dessas substâncias. À semelhança do 2,3-BPG, os íons hidrogênio e o dióxido de carbono são *efetores alostéricos* da hemoglobina, que se ligam a sítios da molécula distintos dos sítios de ligação ao oxigênio. A regulação da ligação de oxigênio pelos íons hidrogênio e pelo dióxido de carbono é denominada *efeito Bohr,* em homenagem a Christian Bohr, que descreveu esse fenômeno em 1904.

A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio reduz à medida que o pH diminui a partir de um valor de 7,4 (Figura 7.19). Em consequência, à medida que a hemoglobina se move para uma região de pH menor, a sua tendência a liberar oxigênio aumenta. Por exemplo, o transporte a partir dos pulmões, com pH de 7,4 e pressão parcial de oxigênio de 100 torr, para o músculo ativo, com pH de 7,2 e pressão parcial de oxigênio de 20 torr, resulta na liberação de oxigênio, que alcança 77% da capacidade total de transporte. Apenas 66% do oxigênio seriam liberados na ausência de qualquer mudança de pH. Estudos estruturais e químicos revelaram muitos aspectos acerca da base química do efeito Bohr. Pelo menos dois conjuntos de grupos químicos são importantes no reconhecimento de mudanças de pH: os grupos α-amino das extremidades aminoterminais da cadeia α e as cadeias laterais de histidinas β146 e α122, cujos valores de pK_a aproximam-se de pH de 7. Considere a histidina β146, o resíduo na extremidade C terminal da cadeia β. Na desoxi-hemoglobina, o grupo carboxilato terminal de β146 forma uma ponte salina com um resíduo de lisina na subunidade α do outro dímero αβ. Essa interação prende a cadeia lateral da histidina β146 em uma posição na qual pode participar de uma ponte salina com o aspartato β94 de carga negativa na mesma cadeia, contanto que o grupo imidazol do resíduo de histidina esteja protonado (Figura 7.20).

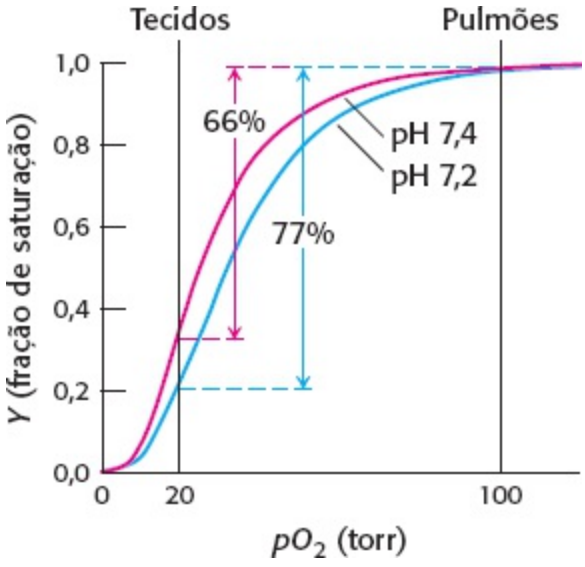


Figura 7.19 Efeito do pH sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. A redução do pH de 7,4 (curva vermelha) para 7,2 (curva azul) resulta em liberação de O_2 pela oxi-hemoglobina.

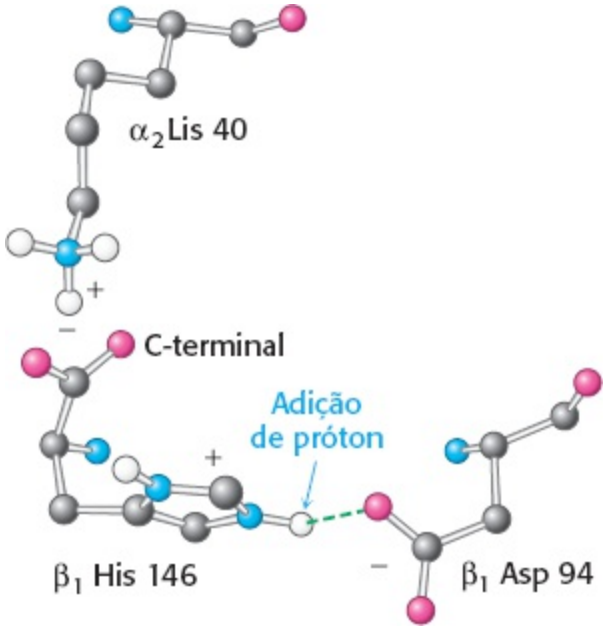


Figura 7.20 Base química do efeito Bohr. Na desoxi-hemoglobina, três resíduos de aminoácidos formam duas pontes salinas que estabilizam a estrutura quaternária T. A formação de uma das pontes salinas depende da presença de um próton adicionado à histidina β146. A proximidade da carga negativa no aspartato β94 da desoxi-hemoglobina favorece a protonação dessa histidina. *Observe* que a ponte salina entre a histidina β146 e o aspartato β94 é estabilizada por uma ponte de hidrogênio (linha verde tracejada).

Os outros grupos também participam das pontes salinas no estado T. *A formação dessas pontes salinas estabiliza o estado T, resultando em maior tendência à liberação de oxigênio.* Por exemplo, na presença de um pH alto, a cadeia lateral da histidina β146 não é protonada, e não há formação da ponte salina. À medida que o pH cai, entretanto, a cadeia lateral de histidina β146 torna-se protonada, forma-se a ponte salina com aspartato β94, e o estado T é estabilizado.

O dióxido de carbono, uma espécie neutra, atravessa a membrana eritrocitária e penetra na célula. Esse transporte também é facilitado por transportadores de membrana, incluindo proteínas associadas aos tipos sanguíneos Rh. O dióxido de carbono estimula a liberação de oxigênio por dois mecanismos. Em primeiro lugar, a presença de altas concentrações de dióxido de carbono provoca queda do pH dentro do eritrócito (Figura 7.21). O dióxido de carbono reage com água, formando ácido carbônico, H_2CO_3. Essa reação é acelerada pela *anidrase carbônica*, uma enzima presente em quantidades abundantes nos eritrócitos que será considerada detalhadamente no Capítulo 9. O H_2CO_3 é um ácido moderadamente forte, com pK_a de 3,5. Por conseguinte, uma vez formado, o ácido carbônico dissocia-se formando o íon bicarbonato, HCO_3^-, e H^+, resultando em queda do pH, que estabiliza o estado T pelo mecanismo discutido anteriormente.

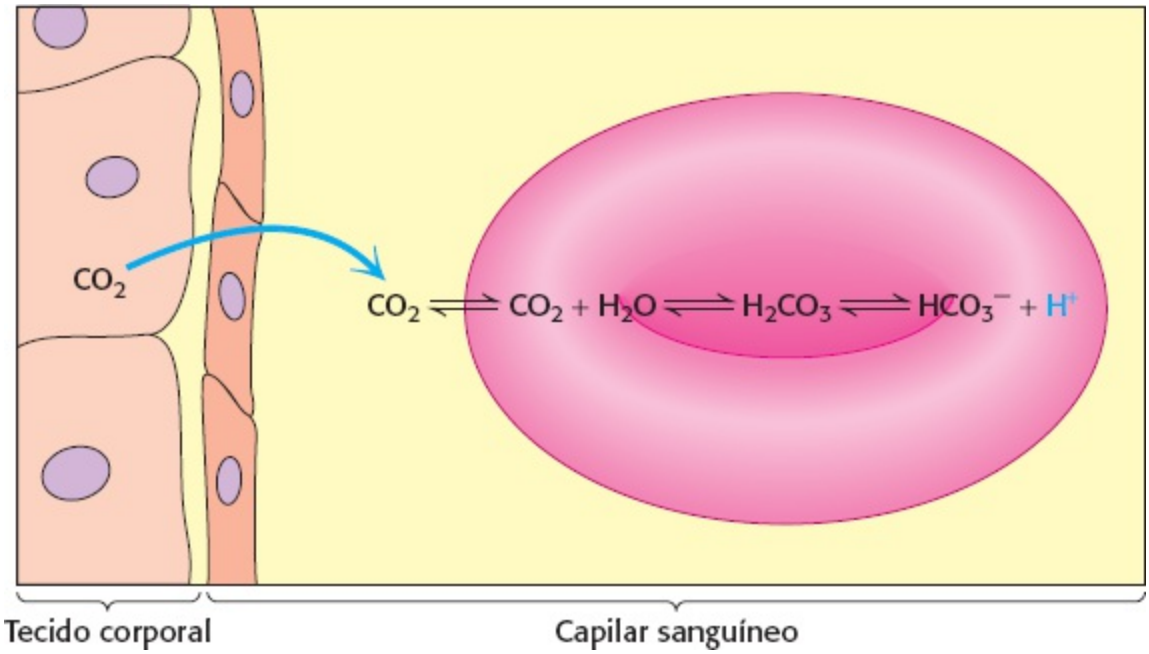


Figura 7.21 Dióxido de carbono e pH. O dióxido de carbono nos tecidos difunde-se para dentro dos eritrócitos. No interior do eritrócito, o dióxido de carbono reage com água, formando ácido carbônico, em uma reação catalisada pela enzima anidrase carbônica. O ácido carbônico dissocia-se para formar HCO_3^- e H^+ resultando em uma queda de pH dentro do eritrócito.

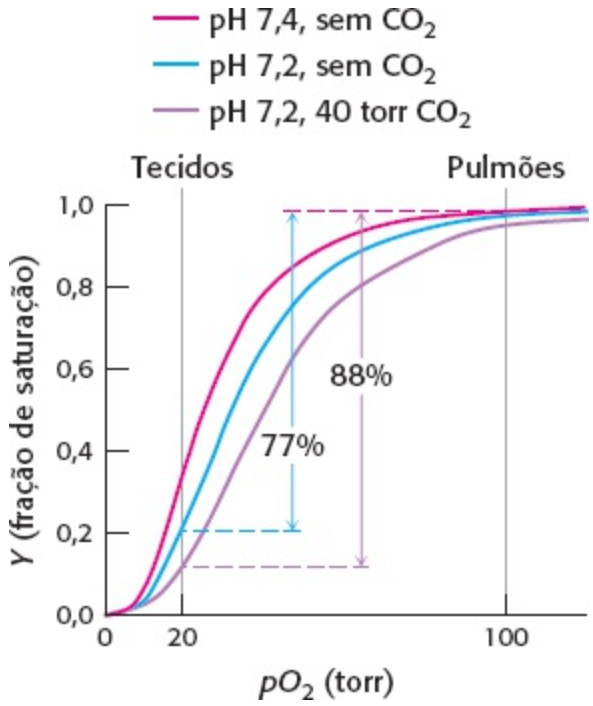
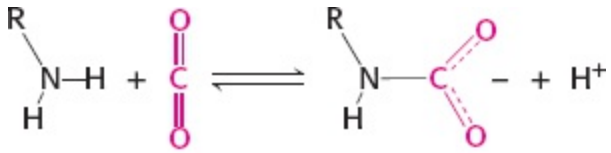


Figura 7.22 Efeitos do dióxido de carbono. A presença de dióxido de carbono diminui a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, mesmo além do efeito devido a uma diminuição do pH, resultando em um transporte de oxigênio ainda mais eficiente dos tecidos para os pulmões.

No segundo mecanismo, uma interação química direta entre o dióxido de carbono e a hemoglobina estimula a liberação de oxigênio. O efeito do dióxido de carbono sobre a afinidade pelo oxigênio pode ser constatado pela comparação das curvas de ligação ao oxigênio na ausência e na presença de dióxido de carbono em um pH constante (Figura 7.22). Na presença de dióxido de carbono em uma pressão parcial de 40 torr, a um pH de 7,2, a quantidade de oxigênio liberada aproxima-se de 90% da capacidade máxima de transporte. O dióxido de carbono estabiliza a desoxi-hemoglobina ao reagir com os grupos aminoterminais para formar grupos *carbamato,* que apresentam carga negativa,

diferentemente das cargas neutras ou positivas nos grupos amino livres.



Carbamato

As extremidades aminoterminais situam-se na interface entre os dímeros αβ, e esses grupos carbamato de carga negativa participam em interações com pontes salinas que estabilizam o estado T, favorecendo a liberação de oxigênio.

A formação de carbamato também proporciona um mecanismo para o transporte de dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões, porém responde por apenas cerca de 14% do transporte total de dióxido de carbono. A maior parte do dióxido de carbono liberado dos eritrócitos é transportada até os pulmões sob a forma de HCO_3^- produzido a partir da hidratação do dióxido de carbono dentro da célula (Figura 7.23). Grande parte do HCO_3^- que é formado deixa a célula por meio de uma proteína de transporte específica de membrana, que troca o HCO_3^- de um lado da membrana pelo Cl^- do outro lado. Por conseguinte, a concentração sérica de HCO_3^- aumenta. Por meio desse mecanismo, uma grande concentração de dióxido de carbono é transportada dos tecidos até os pulmões na forma de HCO_3^-. Nos pulmões, esse processo é revertido: o HCO_3^- é convertido de volta em dióxido de carbono e exalado. Assim, o dióxido de carbono gerado pelos tecidos ativos contribui para uma diminuição do pH eritrocitário, e portanto para a liberação de oxigênio, e é convertido em uma forma passível de ser transportada no soro e liberada nos pulmões.

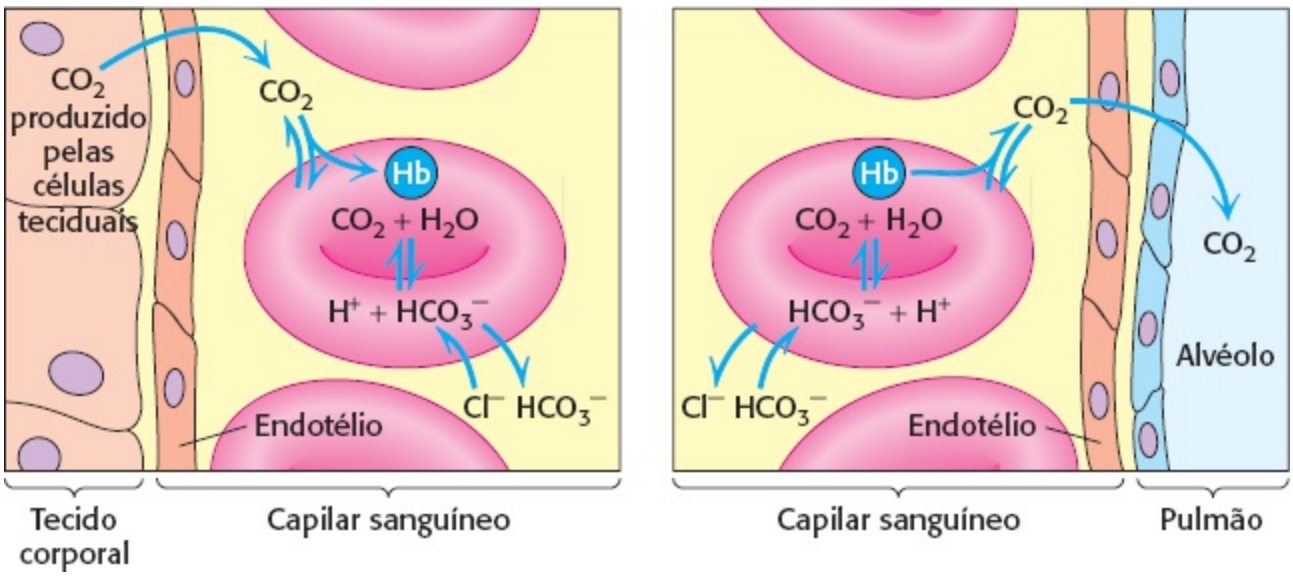


Figura 7.23 Transporte de CO_2 dos tecidos para os pulmões. A maior parte do dióxido de carbono é transportada dos pulmões sob a forma de HCO_3^-, produzida nos eritrócitos e, em seguida, liberada no plasma sanguíneo. Uma quantidade menor é transportada pela hemoglobina na forma de carbamato ligado.

7.4 Mutações nos genes que codificam as subunidades da hemoglobina podem resultar em doença

Na época atual, particularmente após o sequenciamento do genoma humano, tornou-se rotina pensar

em variações geneticamente codificadas na sequência de proteínas como um fator envolvido em doenças específicas. A noção de que doenças poderiam ser causadas por defeitos moleculares foi proposta por Linus Pauling, em 1949 (4 anos antes da proposta da dupla hélice de DNA por Watson e Crick) para explicar a doença sanguínea conhecida como *anemia falciforme*. O nome desse distúrbio provém da forma anormal em foice dos eritrócitos privados de oxigênio, que são observados em indivíduos que sofrem dessa doença (Figura 7.24). Pauling propôs que a anemia falciforme poderia ser causada por uma variação específica na sequência de aminoácidos de uma cadeia da hemoglobina. Hoje em dia, sabemos que essa hipótese audaciosa é correta. De fato, cerca de 7% da população mundial é portadora de algum distúrbio da hemoglobina causado por uma variação na sua sequência de aminoácidos. Para concluir este capítulo, concentremo-nos em dois dos mais importantes desses distúrbios: a anemia falciforme e a talassemia.

Figura 7.24 Eritrócitos falciformes. Micrografia mostrando um eritrócito afoiçado adjacente a eritrócitos normais. [Eye of Science/Photo Researchers.]

Anemia falciforme resulta da agregação de moléculas mutantes de desoxi-hemoglobina

Os indivíduos com eritrócitos afoiçados apresentam vários sintomas perigosos. O exame do conteúdo desses eritrócitos revela que as moléculas de hemoglobina formam grandes agregados fibrosos (Figura 7.25). Essas fibras estendem-se através dos eritrócitos, distorcendo-os de modo a causar oclusão de pequenos capilares, comprometendo o fluxo sanguíneo. Os resultados podem incluir tumefação dolorosa dos membros e maior risco de acidente vascular encefálico ou infecção bacteriana (devido à circulação deficiente). Os eritrócitos afoiçados também não permanecem na circulação pelo mesmo tempo que as células normais, levando ao desenvolvimento de anemia.

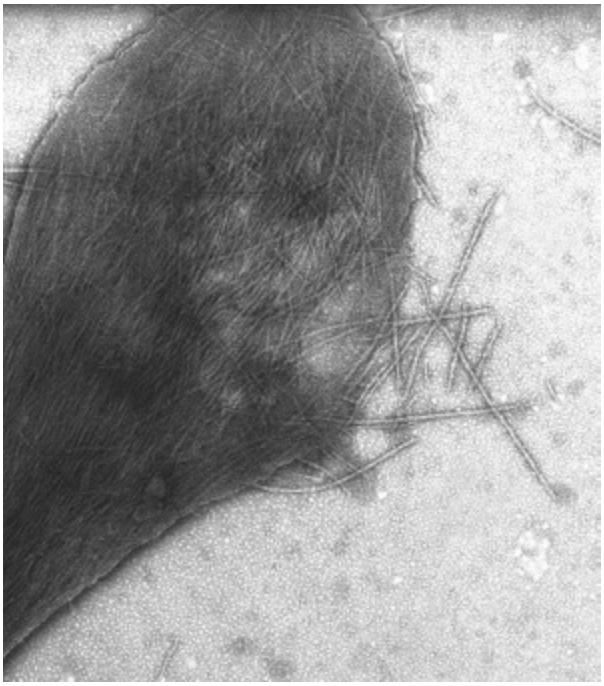


Figura 7.25 Fibras de hemoglobina falciforme. Micrografia eletrônica mostrando um eritrócito afoiçado rompido, com fibras de hemoglobina falciforme emergindo. [Cortesia de Robert Josephs e Thomas E. Wellems, University of Chicago.]

Qual é o defeito molecular associado à anemia falciforme? Utilizando técnicas cromatográficas recém-desenvolvidas, Vernon Ingram demonstrou, em 1956, que uma única substituição de aminoácido na cadeia β da hemoglobina é o fator responsável – isto é, a substituição do glutamato por um resíduo de valina na posição 6. A forma mutante é designada como *hemoglobina S* (HbS). Em indivíduos com anemia falciforme, ambos os alelos do gene da cadeia β da hemoglobina (HbB) foram mutados. A substituição na HbS diminui substancialmente a solubilidade da desoxi-hemoglobina, embora não altere de modo acentuado as propriedades da oxi-hemoglobina.

O exame da estrutura da hemoglobina S revela que o novo resíduo de valina situa-se na superfície da molécula no estado T (Figura 7.26). Esse novo segmento hidrofóbico interage com outro segmento hidrofóbico formado por Fen 85 e Val 88 na cadeia β de uma molécula vizinha, iniciando o processo de agregação. Uma análise mais detalhada revela que uma única fibra de hemoglobina S é constituída de 14 cadeias de moléculas de hemoglobina com múltiplas interligações. Por que esses agregados não se formam quando a hemoglobina S está oxigenada? A oxi-hemoglobina S está no estado R, e os resíduos Fen 85 e Val 88 na cadeia β estão, em grande parte, mergulhados dentro da montagem da hemoglobina. Sem um parceiro com o qual interagir, o resíduo Val na superfície na posição 6 é benigno.

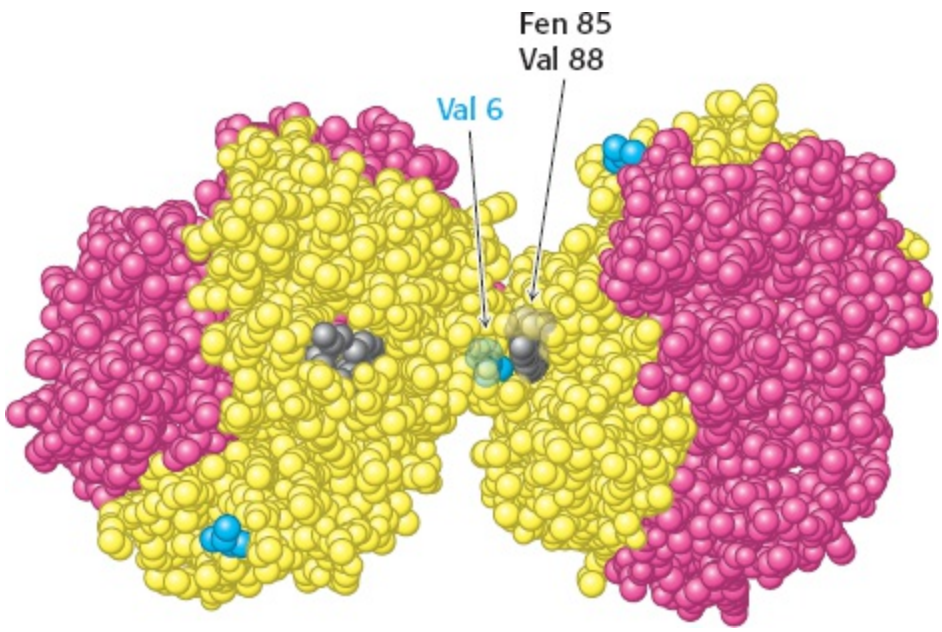


Figura 7.26 Hemoglobina S desoxigenada. A interação entre Val 6 (azul) em uma cadeia β de uma molécula de hemoglobina com um segmento hidrofóbico formado por Fen 85 e Val 88 (cinza) em uma cadeia β de outra molécula de hemoglobina desoxigenada leva à agregação da hemoglobina. Os resíduos Val 6 expostos de outras cadeias β participam de outras interações desse tipo nas fibras de hemoglobina S. [Desenhada a partir de 2HBS.pdb.]

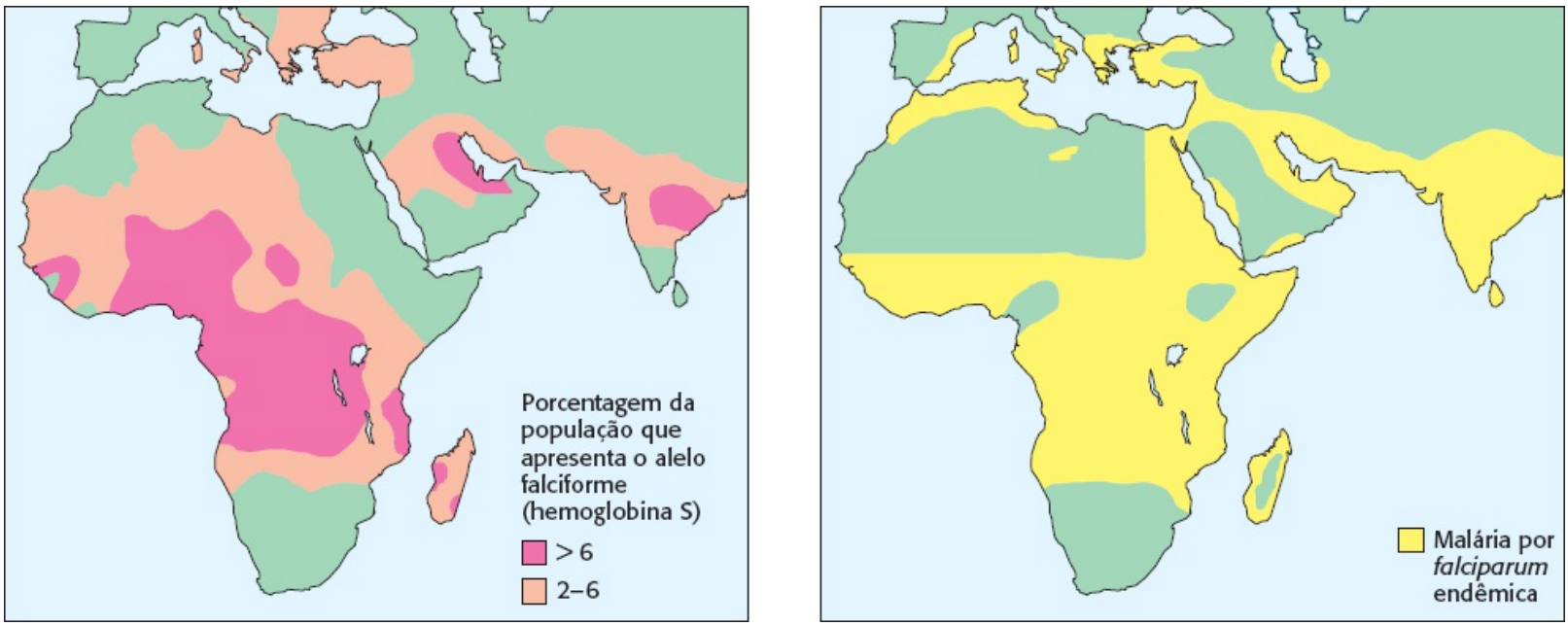


Figura 7.27 Caráter falciforme e malária. Observa-se a existência de uma correlação significativa entre as regiões com alta frequência do alelo HbS e as regiões com alta prevalência de malária.

Cerca de 1 em 100 africanos do oeste sofre de anemia falciforme. Tendo em vista as consequências frequentemente devastadoras da doença, por que a mutação para a HbS é tão prevalente na África e em algumas outras regiões? Convém lembrar que ambas as cópias do gene HbB estão mutadas nos indivíduos com anemia falciforme. Os indivíduos com uma cópia do gene HbB e uma cópia do gene HbS não são relativamente afetados. Diz-se que esses indivíduos apresentam o *caráter falciforme,* pois podem transmitir o gene HbS para a sua prole. Todavia, os indivíduos com caráter falciforme são resistentes à *malária,* uma doença transmitida por um parasito, o *Plasmodium falciparum,* que vive dentro dos eritrócitos em um estágio de seu ciclo de vida. Considerando o efeito calamitoso da malária sobre a saúde e a probabilidade de reprodução nas

regiões onde a malária é historicamente endêmica, os indivíduos portadores do caráter falciforme foram favorecidos, o que aumentou a prevalência do alelo HbS (Figura 7.27).

A talassemia é causada por um desequilíbrio na produção das cadeias de hemoglobina

A anemia falciforme é causada pela substituição de um único aminoácido específico em uma cadeia da hemoglobina. A *talassemia,* o outro distúrbio hereditário prevalente da hemoglobina, é causada pela perda ou por uma redução substancial de uma única *cadeia* de hemoglobina. Isso resulta em baixos níveis de hemoglobina funcional e na produção diminuída de eritrócitos, podendo levar ao desenvolvimento de anemia, fadiga, palidez da pele e disfunção hepática e esplênica. A talassemia é um conjunto de doenças relacionadas. Na talassemia α, a cadeia α da hemoglobina não é produzida em quantidade suficiente. Em consequência, formam-se tetrâmeros de hemoglobina que só contêm a cadeia β. Esses tetrâmeros, denominados *hemoglobina H* (HbH), ligam-se ao oxigênio com alta afinidade e de modo não cooperativo. Em consequência, a liberação de oxigênio nos tecidos é precária. Na talassemia β, a cadeia β da hemoglobina não é produzida em quantidade suficiente. Na ausência de cadeias β, as cadeias α formam agregados insolúveis que precipitam dentro dos eritrócitos imaturos. A perda dos eritrócitos resulta em anemia. A forma mais grave da talassemia β é denominada *talassemia major* ou *anemia de Cooley*.

Tanto a talassemia α quanto a talassemia β estão associadas a muitas variações genéticas diferentes e exibem uma ampla gama de gravidade clínica. As formas mais graves de talassemia α são habitualmente fatais pouco antes ou logo depois do nascimento. Entretanto, essas formas são relativamente raras. Um exame do repertório de genes da hemoglobina no genoma humano fornece uma explicação. Normalmente, os seres humanos não apresentam dois, mas quatro alelos para a cadeia α, dispostos de tal modo que os dois genes ficam localizados adjacentes um ao outro em uma extremidade de cada cromossomo 16. Assim, a perda completa de expressão da cadeia α requer a ruptura de quatro alelos. A talassemia β é mais comum, visto que os seres humanos normalmente apresentam apenas dois alelos para a cadeia β, um em cada cópia do cromossomo 11.

O acúmulo de cadeias α livres de hemoglobina é evitado

A presença de quatro genes para expressar a cadeia α, em comparação com dois para a cadeia β, sugere que a cadeia α seria produzida em excesso (tendo em vista a simples suposição de que a expressão de proteína de cada gene seja comparável). Se isso for correto, por que o excesso de cadeias α não precipita? Um mecanismo para manter as cadeias α em solução foi revelado pela descoberta de uma proteína 11 kDa nos eritrócitos, denominada *proteína estabilizadora da cadeia α da hemoglobina* (AHSP, do inglês *α-hemoglobin stabilizing protein*). Essa proteína forma um complexo solúvel especificamente com os monômeros de cadeia α recém-sintetizados. A estrutura cristalográfica de um complexo entre a AHSP e a cadeia α da hemoglobina revela que a AHSP se liga à mesma face da cadeia α que se liga à cadeia β (Figura 7.28). A AHSP liga-se à cadeia α nas formas tanto desoxigenada quanto oxigenada. No complexo com oxigênio ligado, a histidina distal, e não a proximal, liga-se ao átomo de ferro.

A AHSP serve para ligar-se à cadeia α da hemoglobina à medida que esta é produzida, assegurando o seu enovelamento correto. À medida que a hemoglobina β é expressa, ela desloca a AHSP, visto que o dímero cadeia α-cadeia β da hemoglobina é mais estável do que o complexo

cadeia α da hemoglobina-ASHP. Assim, a AHSP impede o enovelamento incorreto, o acúmulo e a precipitação de cadeia α livre da hemoglobina. Estudos estão sendo realizados para determinar se as mutações no gene que codifica a AHSP desempenham um papel na modulação da gravidade da talassemia β.

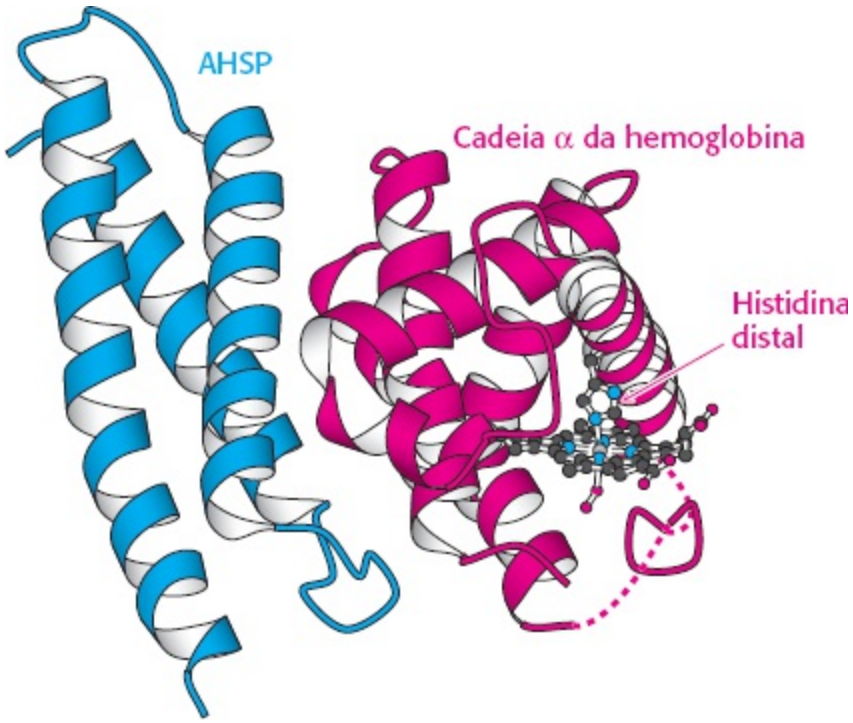


Figura 7.28 Estabilização da cadeia α de hemoglobina livre. A figura mostra a estrutura de um complexo entre AHSP e a cadeia α da hemoglobina. Neste complexo, o átomo de ferro está ligado ao oxigênio e à histidina distal. *Observe* que a AHSP se liga à mesma superfície da cadeia α à qual se liga a cadeia β da hemoglobina. [Desenhada a partir de 1YO1. pdb.]

Globinas adicionais são codificadas no genoma humano

Além do gene para a mioglobina, dos dois genes para a cadeia α e de um para a cadeia β da hemoglobina, o genoma haploide humano contém outros genes de globina. Já vimos a hemoglobina fetal, que contém a cadeia γ no lugar da cadeia β. Vários outros genes codificam outras subunidades de hemoglobina que são expressas durante o desenvolvimento, incluindo as cadeias δ, ∈ e ζ.

O exame da sequência do genoma humano revelou duas globinas adicionais, ambas são monoméricas e se assemelham mais à mioglobina do que à hemoglobina. A primeira, a *neuroglobina,* é expressa principalmente no cérebro e, em níveis particularmente altos, na retina. A neuroglobina pode desempenhar um papel na proteção dos tecidos neurais contra a hipoxia (quantidade insuficiência de oxigênio). A segunda, a *citoglobina,* é expressa mais amplamente por todo o corpo. Os estudos estruturais e espectroscópicos realizados revelaram que, tanto na neuroglobina quanto na citoglobina, as histidinas proximal e distal são coordenadas ao átomo de ferro na forma desoxi. A ligação do oxigênio desloca a histidina distal. Estudos futuros deverão elucidar as funções desses membros da família de globinas.

Resumo

7.1 O oxigênio liga-se aos átomos de ferro do heme da mioglobina e hemoglobina

A mioglobina é, em grande parte, uma proteína com α–hélices, que se liga ao grupo prostético heme. O heme é constituído de protoporfirina, um componente orgânico com quatro anéis pirrólicos ligados e um íon ferro central no estado Fe^{2+}. O íon ferro é coordenado à cadeia lateral de um resíduo de histidina na mioglobina, denominado histidina proximal. Um dos átomos de oxigênio no O_2 liga-se a um sítio de coordenação aberto no ferro. Em virtude da transferência parcial de elétrons do ferro para o oxigênio, o íon ferro move-se para dentro do plano da porfirina com a ligação do oxigênio. A hemoglobina é constituída de quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias α e duas cadeias β. Cada uma dessas cadeias assemelha-se na sequência de aminoácidos à mioglobina e enovela-se em uma estrutura tridimensional muito semelhante. O tetrâmero de hemoglobina é mais bem descrito como um par de dímeros αβ.

7.2 A hemoglobina liga-se ao oxigênio de modo cooperativo

A curva de ligação da mioglobina ao oxigênio revela um processo de ligação de equilíbrio simples. A mioglobina é semissaturada de oxigênio em uma concentração de oxigênio de aproximadamente 2 torr. A curva de ligação de oxigênio para a hemoglobina tem uma forma semelhante a um "S" (sigmoide), indicando que a ligação ao oxigênio é cooperativa. A ligação do oxigênio a um sítio dentro do tetrâmero de hemoglobina afeta as afinidades dos outros sítios pelo oxigênio. A ligação e a liberação cooperativas de oxigênio aumentam significativamente a eficiência do transporte de oxigênio. A magnitude da capacidade potencial de transporte de oxigênio utilizada no transporte de oxigênio dos pulmões (com uma pressão parcial de oxigênio de 100 torr) para os tecidos (com uma pressão parcial de oxigênio de 20 torr) é de 66%, em comparação com 7% se a mioglobina fosse usada como carreador de oxigênio.

A estrutura quaternária da hemoglobina modifica-se com a ligação ao oxigênio. A estrutura da desoxi-hemoglobina é denominada estado T. A estrutura da oxi-hemoglobina é designada como estado R. Os dois dímeros αβ rotam em aproximadamente 15° um em relação ao outro na transição do estado T para o estado R. A ligação cooperativa pode ser potencialmente explicada pelos modelos concertado e sequencial. No modelo concertado, cada molécula de hemoglobina adota o estado T ou o estado R; o equilíbrio entre esses dois estados é determinado pelo número de sítios de ligação de oxigênio ocupados. Os modelos sequenciais possibilitam estruturas intermediárias. As mudanças estruturais nos sítios de ferro em resposta à ligação de oxigênio são transmitidas para a interface entre os dímeros αβ, influenciando o equilíbrio T para R.

Os eritrócitos contêm 2,3-bifosfoglicerato em concentrações aproximadamente iguais à da hemoglobina. O 2,3-BPG liga-se firmemente ao estado T, mas não ao estado R, estabilizando o estado T e diminuindo a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. A hemoglobina fetal liga-se ao oxigênio mais firmemente do que a hemoglobina do adulto, devido a uma ligação mais fraca do 2,3-BPG. Essa diferença possibilita a transferência de oxigênio do sangue materno para o fetal.

7.3 Os íons hidrogênio e o dióxido de carbono promovem a liberação de oxigênio | O efeito Bohr

As propriedades de ligação da hemoglobina ao oxigênio são acentuadamente afetadas pelo pH e pela presença de dióxido de carbono, um fenômeno conhecido como efeito Bohr. O aumento da concentração de íons hidrogênio – isto é, a redução do pH – diminui a afinidade da hemoglobina

pelo oxigênio, devido à protonação das extremidades aminoterminais e de certos resíduos de histidina. Os resíduos protonados ajudam a estabilizar o estado T. O aumento das concentrações de dióxido de carbono diminui a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio por dois mecanismos. No primeiro, o dióxido de carbono é convertido em ácido carbônico, que diminui a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio ao reduzir o pH dentro dos eritrócitos. No segundo mecanismo, o dióxido de carbono é adicionado às extremidades aminoterminais da hemoglobina, formando carbamatos. Esses grupos de carga negativa estabilizam a desoxi-hemoglobina por meio de interações iônicas. Como os íons hidrogênio e o dióxido de carbono são produzidos nos tecidos de metabolismo rápido, o efeito Bohr ajuda a liberar o oxigênio nos locais onde ele é mais necessário.

7.4 Mutações nos genes que codificam as subunidades da hemoglobina podem resultar em doença

A doença falciforme é causada por uma mutação na cadeia β da hemoglobina, que substitui um resíduo de glutamato por um resíduo de valina. Em consequência, forma-se um segmento hidrofóbico na superfície da desoxi-hemoglobina (estado T), que leva à formação de polímeros fibrosos. Essas fibras distorcem os eritrócitos, que adquirem formas de foice. A doença falciforme foi a primeira doença a ser associada a uma mudança na sequência de aminoácidos de uma proteína. As talassemias são doenças causadas pela produção reduzida de cadeias α ou β, produzindo tetrâmeros de hemoglobina que contêm apenas um tipo de cadeia de hemoglobina. Essas moléculas de hemoglobina caracterizam-se por liberação precária de oxigênio e baixa solubilidade, levando à destruição dos eritrócitos durante o seu desenvolvimento. Os precursores dos eritrócitos normalmente provocam um ligeiro excesso de cadeias α da hemoglobina em comparação com as cadeias β. Para evitar a agregação do excesso de cadeias α, eles produzem uma proteína estabilizadora de cadeia α da hemoglobina, que se liga especificamente a monômeros de cadeia α recém-sintetizados, formando um complexo solúvel.

Apêndice | Pode-se formular modelos de ligação em termos quantitativos: o traçado de Hill e o modelo concertado simétrico

O traçado de Hill

Um método útil de descrever quantitativamente os processos de ligação cooperativos, como o da hemoglobina, foi desenvolvido por Archibald Hill em 1913. Considere o equilíbrio *hipotético* para uma proteína X ligando-se a um ligante S:

$$X + nS \rightleftharpoons X(S)_n \qquad (1)$$

em que n é uma variável que pode ter valores tanto inteiros quanto fracionários. O parâmetro n é uma medida do grau de cooperatividade na ligação do ligante, embora não tenha um significado mais profundo, visto que a equação 1 não representa um processo físico real. Para X = hemoglobina e S = O_2, o valor máximo de n é 4. O valor de $n = 4$ seria aplicável se a ligação do oxigênio à hemoglobina fosse totalmente cooperativa. Se a ligação do oxigênio fosse totalmente não cooperativa, n seria

então 1.

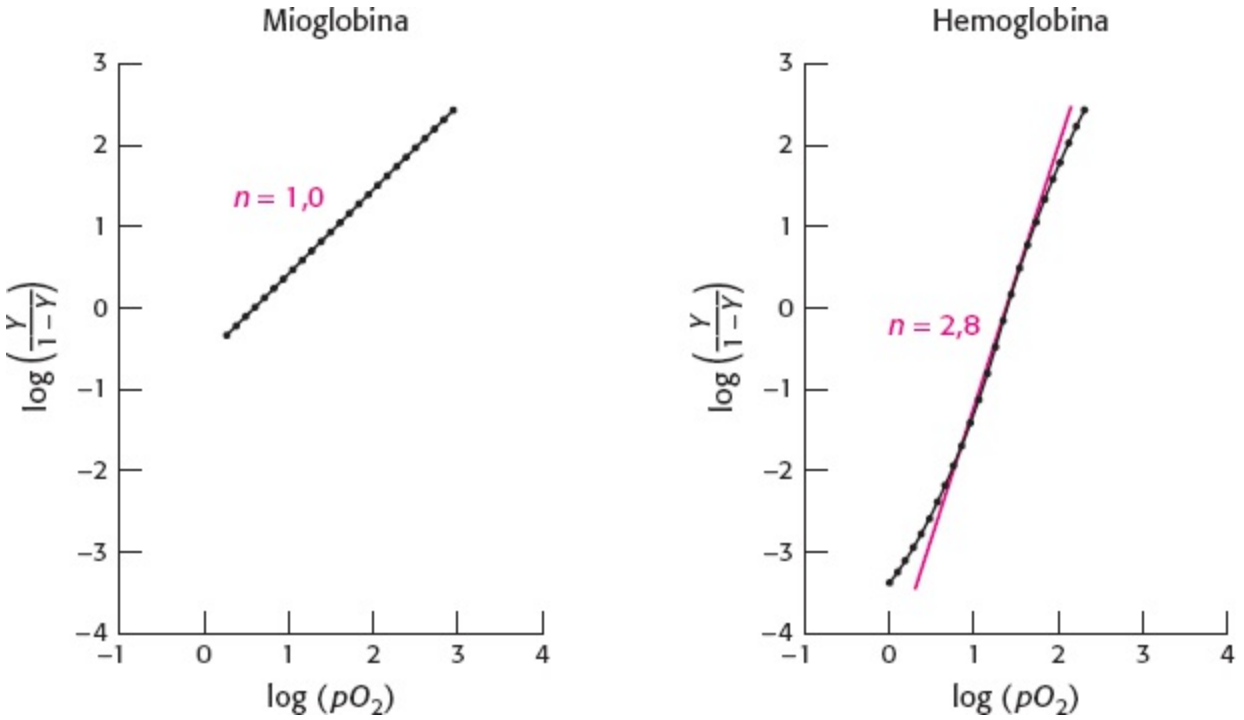


Figura 7.29 Traçados de Hill para a mioglobina e a hemoglobina.

A análise do equilíbrio na equação 1 produz a seguinte equação para a fração de saturação, *Y*:

$$Y = \frac{[S]^n}{[S]^n + [S_{50}]^n}$$

em que $[S_{50}]$ é a concentração em que X está meio saturado. Para a hemoglobina, essa expressão torna-se

$$Y = \frac{pO_2{}^n}{pO_2{}^n + P_{50}{}^n}$$

em que P_{50} é a pressão parcial de oxigênio em que a hemoglobina está meio saturada. Essa expressão pode ser reorganizada em:

$$\frac{Y}{1 - Y} = \frac{pO_2{}^n}{P_{50}{}^n}$$

e, assim,

$$\log\left(\frac{Y}{1 - Y}\right) = \log\left(\frac{pO_2{}^n}{P_{50}{}^n}\right) = n \log(pO_2) - n \log(P_{50})$$

Essa equação prevê que o gráfico de log (Y/1 – Y) *versus* log (P_{50}), denominado *traçado de Hill*, deve ser linear, com uma inclinação de n.

Os traçados de Hill para a mioglobina e para a hemoglobina são mostrados na Figura 7.29. Para a mioglobina, o gráfico de Hill é linear, com uma inclinação de 1. Para a hemoglobina, o traçado de

Hill não é totalmente linear, visto que o equilíbrio no qual se baseia o traçado de Hill não está totalmente correto. Entretanto, o traçado é aproximadamente linear no centro, com uma inclinação de 2,8. A inclinação, frequentemente denominada *coeficiente de Hill*, é uma medida da cooperatividade da ligação ao oxigênio. A utilidade do traçado de Hill é que ele fornece uma avaliação quantitativa derivada simplesmente do grau de cooperatividade na ligação. Com o uso da equação de Hill e do coeficiente de Hill derivado, obtém-se uma curva de ligação que se assemelha estreitamente à da hemoglobina (Figura 7.30).

O modelo concertado

O modelo concertado coordenado pode ser formulado em termos quantitativos. São necessários apenas quatro parâmetros: (1) o número de sítios de ligação (que supostamente são equivalentes) na proteína, (2) a razão das concentrações entre os estados T e R na ausência de ligantes ligados, (3) a afinidade de sítios nas proteínas no estado R para a ligação de ligantes e (4) uma medida da firmeza de ligação entre as subunidades nas proteínas no estado R e os ligantes em comparação com as subunidades no estado T. O número de sítios de ligação, n, é habitualmente conhecido a partir de outras informações. Para a hemoglobina, $n = 4$. A razão das concentrações entre os estados T e R sem ligantes ligados é uma constante:

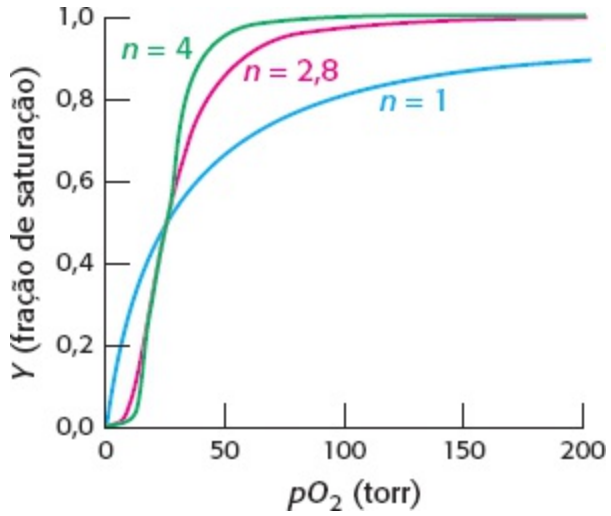


Figura 7.30 Curvas de ligação ao oxigênio para vários coeficientes de Hill. A curva indicada com n = 2,8 assemelha-se estreitamente à curva da hemoglobina.

$$L = [T_0]/[R_0]$$

em que o subscrito refere-se ao número de ligantes ligados (neste caso, zero). A afinidade das subunidades no estado R é definida pela constante de dissociação para a ligação de um ligante a um único sítio no estado R, K_R. Similarmente, a constante de dissociação para a ligação de um ligante a um único sítio no estado T é K_T. Podemos definir a razão entre essas duas constantes de dissociação como:

$$c = K_R/K_T$$

Esta é a medida de quanto mais firmemente uma subunidade de uma proteína no estado R liga-se a um ligante em comparação com uma subunidade de uma proteína no estado T. Observe que $c < 1$, visto que K_R e K_T são constantes de dissociação, e a ligação firme corresponde a uma pequena constante

de dissociação.

Qual é a razão entre a concentração de proteínas no estado T com um ligante ligado e a concentração de proteínas no estado R com um ligante ligado? A constante de dissociação para um único sítio no estado R é K_R. Para uma proteína com n sítios, existem n sítios possíveis para a ligação do primeiro ligante. Esse fator estatístico favorece a ligação de ligante em comparação com uma proteína de sítio único. Por conseguinte, $[R_1] = n[R_0][S]/K_R$. De modo semelhante, $[T_1] = n[T_0][S]/K_T$. Assim,

$$[T_1]/[R_1] = \frac{n[T_0][S]/K_T}{n[R_0][S]/K_R} = \frac{[T_0]}{[R_0](K_R/K_T)} = cL$$

Uma análise semelhante revela que, para estados com ligantes ligados i, $[T_i]/[R_i] = c^iL$. Em outras palavras, a razão entre as concentrações do estado T e do estado R é reduzida por um fator de c para cada ligante que se liga.

Definamos uma escala conveniente para a concentração de S:

$$\alpha = [S]/K_R$$

Essa definição é útil, visto que é a razão da concentração de S para a constante de dissociação que determina o grau de ligação. Usando essa definição, vemos que

$$[R_1] = \frac{n[R_0][S]}{K_R} = n[R_0]\alpha$$

Similarmente,

$$[T_1] = \frac{n[T_0][S]}{K_T} = ncL[R_0]\alpha$$

Qual é a concentração de moléculas no estado R com dois ligantes ligados? Mais uma vez, precisamos considerar o fator estatístico – isto é, o número de modos pelos quais um segundo ligante pode ligar-se a uma molécula com um sítio ocupado. O número de modos é $n - 1$. Entretanto, como não importa qual ligante será o "primeiro" e qual será o "segundo", precisamos dividir por um fator de 2. Assim,

$$\begin{aligned}
[R_2] &= \frac{\left(\frac{n-1}{2}\right)[R_1][S]}{K_R} \\
&= \left(\frac{n-1}{2}\right)[R_1]\alpha \\
&= \left(\frac{n-1}{2}\right)(n[R_0]\alpha)\alpha \\
&= n\left(\frac{n-1}{2}\right)[K_0]\alpha^2
\end{aligned}$$

Podemos deduzir equações semelhantes para o caso com i ligantes ligados e para os estados T.

Podemos agora calcular a fração de saturação, Y. Trata-se da concentração total de sítios com ligantes ligados, dividida pela concentração total de sítios potenciais de ligação. Assim,

$$Y = \frac{([R_1] + [T_1]) + 2([R_2] + [T_2]) + \cdots + n([R_n] + [T_n])}{n([R_0] + [T_0] + [R_1] + [T_1] + \cdots + [R_n] + [T_n])}$$

Fazendo substituições nessa equação, encontramos

$$Y = \frac{n[R_0]\alpha + nc[T_0]\alpha + 2(n(n-1)/2)[R_0]\alpha^2 + 2(n(n-1)/2)c^2[T_0]\alpha^2 + \cdots + n[R_0]\alpha^n + nc^n[T^0])\alpha^n}{n([R_0] + [T_0] + n[R_0]\alpha + nc[T_0]\alpha + \cdots + [R_0]\alpha^n + c^n[T_0]\alpha^n)}$$

Fazendo a substituição $[T_0] = L[R_0]$ e somando essas séries, obtemos

$$Y = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + Lc\alpha(1+c\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L(1+c\alpha)^n}$$

Podemos agora usar essa equação para ajustar os dados observados para a hemoglobina, variando os parâmetros L, c e K_R (com $n = 4$). Obtém-se um excelente ajuste com $L = 9.000$, $c = 0{,}014$ e $K_R = 2{,}5$ torr (Figura 7.31).

Além da fração de saturação, são mostradas as concentrações das espécies T_0, T_1, T_2, R_2, R_3 e R_4. As concentrações de todas as outras formas são muito baixas. A soma das concentrações é uma grande diferença entre a análise que utiliza a equação de Hill e essa análise do modelo concertado. A equação de Hill só fornece a fração de saturação, enquanto a análise do modelo concertado produz concentrações para todas as espécies. No presente caso, essa análise fornece a razão esperada entre proteínas no estado T e proteínas no estado R em cada estágio de ligação. Essa razão muda de 9.000 para 126, para 1,76, para 0,025 e para 0,00035 com zero, uma, duas, três e quatro moléculas de oxigênio ligadas. Essa razão fornece uma medida quantitativa do deslocamento da população de moléculas de hemoglobina do estado T para o estado R.

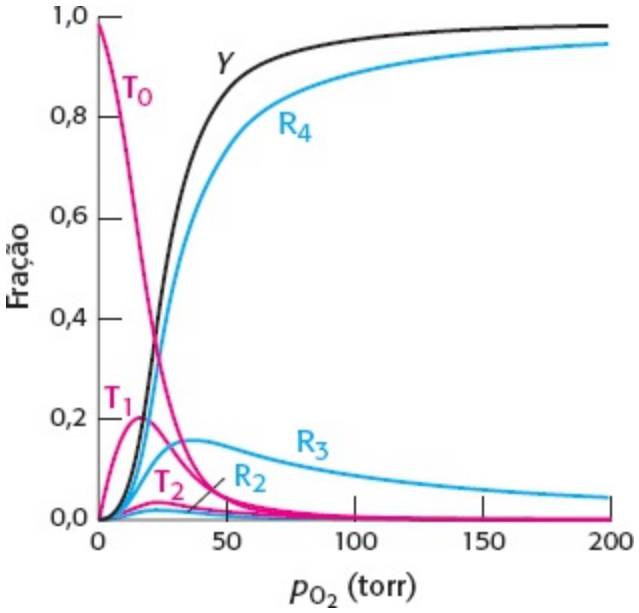


Figura 7.31 Modelo de ligação do oxigênio com o modelo concertado. A fração de saturação (*Y*) em função de $p_{O}2$: *L* = 9.000, *c* = 0,014 e K_R = 2,5 torr. São mostradas as frações de moléculas no estado T com zero, uma e duas moléculas de oxigênio ligadas (T_0, T_1 e T_2) e as frações de moléculas no estado R com duas, três e quatro moléculas de oxigênio ligadas (R_2, R_3 e R_4). As frações de moléculas em outras formas são demasiado baixas para serem mostradas.

O modelo sequencial também pode ser formulado em termos quantitativos. Todavia, a formulação envolve muito mais parâmetros, e muitos conjuntos diferentes de parâmetros frequentemente produzem ajustes semelhantes aos dados experimentais.

Palavras-chave

anemia falciforme (p. 211)
anidrase carbônica (p. 209)
ânion superóxido (p. 200)
2,3-bifosfoglicerato (p. 206)
cadeia α (p. 201)
cadeia β (p. 201)
carbamato (p. 210)
carboxi-hemoglobina (p. 207)
citoglobina (p. 214)
coeficiente de Hill (p. 216)
curva de ligação do oxigênio (p. 201)
dímero αβ (p. 201)
efeito Bohr (p. 208)
enovelamento do tipo globina (p. 201)
estado R (p. 204)
estado T (p. 204)
fração de saturação (p. 201)
heme (p. 198)
hemoglobina fetal (p. 207)
hemoglobina H (p. 212)
hemoglobina S (p. 211)
histidina distal (p. 200)
histidina proximal (p. 199)
ligação cooperativa (p. 202)
malária (p. 212)

metamioglobina (p. 200)
modelo concertado ou coordenado (modelo MWC) (p. 204)
modelo sequencial (p. 205)
monóxido de carbono (p. 207)
neuroglobina (p. 214)
pressão parcial (p. 201)
proteína estabilizadora da cadeia α de hemoglobina (AHSP) (p. 213)
protoporfirina (p. 198)
ressonância magnética funcional (RMf) (p. 199)
sigmoide (p. 202)
talassemia (p. 212)
talassemia major (anemia de Cooley) (p. 212)
traçado de Hill (p. 216)

Questões

1. *Triagem da biosfera.* A primeira proteína a ter a sua estrutura determinada foi a mioglobina de cachalote. Proponha uma explicação para o fato de que o músculo de cachalote constitui uma fonte rica dessa proteína.

2. *Conteúdo de hemoglobina.* O volume médio de um eritrócito é de 87 μm^3. A concentração média de hemoglobina nos eritrócitos é de 0,34 g ml^{-1}.

(a) Qual é o peso da hemoglobina contida em um eritrócito médio?

(b) Quantas moléculas de hemoglobina existem em um eritrócito médio? Suponha que o peso molecular do tetrâmero de hemoglobina humana seja de 65 kDa.

(c) A concentração de hemoglobina nos eritrócitos poderia ser muito maior do que o valor observado? (Dica: Suponha que um eritrócito contenha uma série cristalina de moléculas de hemoglobina em uma rede cúbica com lados de 65 Å.)

3. *Conteúdo de ferro.* Qual a quantidade de ferro presente na hemoglobina de um adulto de 70 kg? Suponha que o volume sanguíneo seja de 70 ml kg^{-1} de peso corporal e que o conteúdo de hemoglobina do sangue seja de 0,16 g ml^{-1}.

4. *Oxigenando a mioglobina.* O conteúdo de mioglobina de alguns músculos no ser humano é de cerca de 8 g kg^{-1}. No cachalote, o conteúdo de mioglobina do músculo é de cerca de 80 g kg^{-1}.

(a) Qual a quantidade de O_2 ligada à mioglobina no músculo humano e no músculo de cachalote? Suponha que a mioglobina esteja saturada com O_2, e que os pesos moleculares da mioglobina humana e da mioglobina do cachalote sejam os mesmos.

(b) A quantidade de oxigênio dissolvido na água tecidual (em equilíbrio com o sangue venoso) a 37°C é de cerca de $3,5 \times 10^{-5}$ M. Qual é a razão entre oxigênio ligado à mioglobina e o oxigênio diretamente dissolvido na água do músculo de cachalote?

5. *Sintonizando a afinidade pelos prótons.* O valor de pK_a de um ácido depende, em parte, de seu ambiente. Faça uma previsão do efeito de cada uma das seguintes mudanças ambientais sobre o valor de pK_a de uma cadeia lateral de ácido glutâmico.

(a) Uma cadeia lateral de lisina é trazida em proximidade.

(b) O grupo carboxilaterminal da proteína é trazido em proximidade.

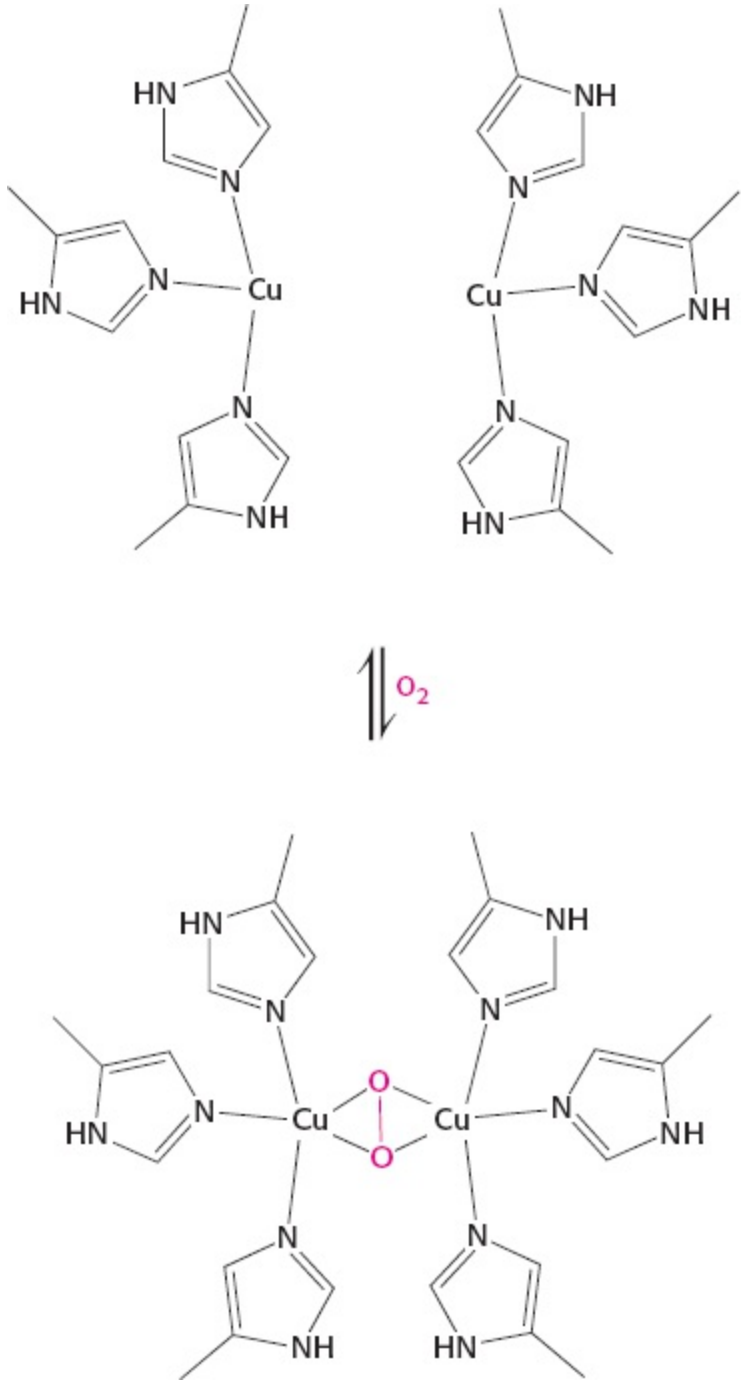
(c) A cadeia lateral de ácido glutâmico é deslocada de fora da proteína para um sítio não polar interno.

6. *Salvação.* A hemoglobina A inibe a formação das fibras longas de hemoglobina S e o afoiçamento subsequente dos eritrócitos com a desoxigenação. Por que a hemoglobina A tem esse efeito?

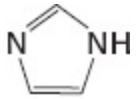
7. *Levando uma carga.* Suponha que você esteja subindo uma montanha alta e que a pressão parcial de oxigênio no ar seja reduzida para 75 torr. Calcule a porcentagem da capacidade de transporte de oxigênio que será utilizada, supondo que o pH dos tecidos e dos pulmões seja de 7,4 e que a concentração de oxigênio nos tecidos seja de 20 torr.

8. *Adaptação a grandes altitudes.* Após passar 1 dia ou mais em grandes altitudes (com uma pressão parcial de oxigênio de 75 torr), a concentração de 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG) nos eritrócitos aumenta. Que efeito teria um aumento da concentração de 2,3-BPG sobre a curva de ligação do oxigênio à hemoglobina? Por que essa adaptação seria benéfica para o bom funcionamento em grandes altitudes?

9. *Vou ficar com a lagosta.* Os artrópodes, como as lagostas, apresentam carreadores de oxigênio muito diferentes da hemoglobina. Os sítios de ligação ao oxigênio não contêm heme, mas baseiam-se em dois íons cobre(I). As mudanças estruturais que acompanham a ligação ao oxigênio são mostradas a seguir. Como essas mudanças poderiam ser usadas para facilitar a ligação cooperativa de oxigênio?



10. *Desligamento.* Com o uso da mutagênese sítio-dirigida, foi preparada uma hemoglobina em que os resíduos proximais de histidina em ambas as subunidades α e β foram substituídos por glicina. O anel imidazólico do resíduo de histidina pode ser substituído pela adição de imidazol livre em solução. Você esperaria que essa hemoglobina modificada apresentasse cooperatividade na ligação do oxigênio? Por que sim ou por que não?

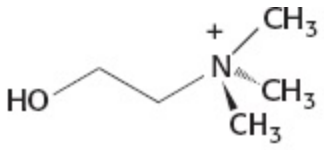


Imidazol

11. *Substituição bem-sucedida.* Os eritrócitos de algumas aves não contêm 2,3-bifosfoglicerato, mas apresentam um dos compostos nas partes *a* a *d,* que desempenha um papel funcional análogo. Que composto você acredita que seja o mais provável para desempenhar essa função? Explique de modo

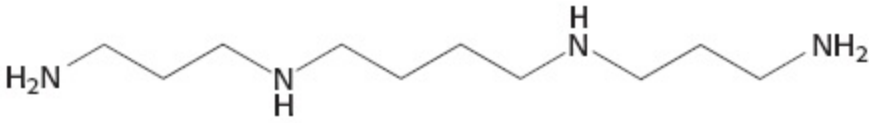
sucinto.

(a)



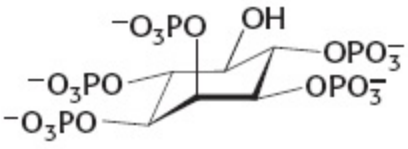
Colina

(b)



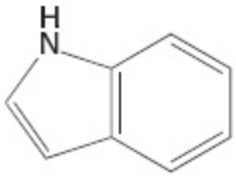
Espermina

(c)



Inositol pentafosfato

(d)



Indol

12. *Curvas teóricas.* (a) Utilizando a equação de Hill, trace uma curva de ligação de oxigênio para uma hemoglobina hipotética de duas subunidades com $n = 1{,}8$ e $P_{50} = 10$ torr. (b) Repita, utilizando o modelo coordenado com $n = 2$, $L = 1.000$, $c = 0{,}01$ e $K_R = 1$ torr.

13. *Efeito parasitário.* Quando o *P. falciparum* reside dentro dos eritrócitos, o metabolismo do parasito tende a liberar ácido. Qual o provável efeito da presença de ácido sobre a capacidade de transporte de oxigênio pelos eritrócitos? Qual a probabilidade de esses eritrócitos sofrerem afoiçamento?

Questões | Interpretação de dados

14. *Ligação primitiva de oxigênio.* As lampreias são organismos primitivos, cujos ancestrais divergiram dos ancestrais dos peixes e mamíferos há aproximadamente 400 milhões de anos. O sangue da lampreia contém uma hemoglobina relacionada com a dos mamíferos. Entretanto, a hemoglobina da lampreia é um monômero no estado oxigenado. Os dados de ligação da hemoglobina da lampreia ao oxigênio são os seguintes:

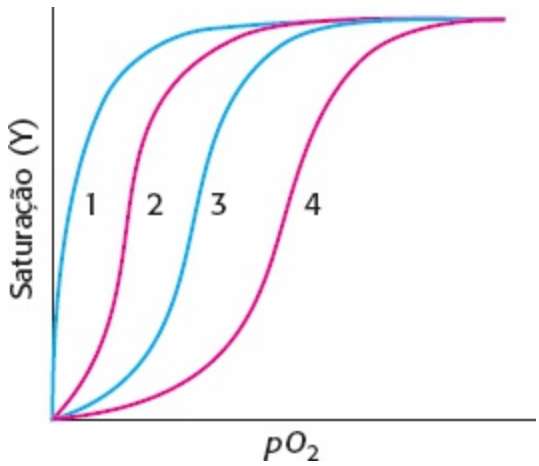
pO_2	Y	pO_2	Y	pO_2	Y
0,1	0,0060	2,0	0,112	50,0	0,889
0,2	0,0124	3,0	0,170	60,0	0,905
0,3	0,0190	4,0	0,227	70,0	0,917
0,4	0,0245	5,0	0,283	80,0	0,927
0,5	0,0307	7,5	0,420	90,0	0,935
0,6	0,0380	10,0	0,500	100	0,941
0,7	0,0430	15,0	0,640	150	0,960
0,8	0,0481	20,0	0,721	200	0,970
0,9	0,0530	30,0	0,812		
1,0	0,591	40,0	0,865		

(a) Represente esses dados graficamente para produzir uma curva de ligação de oxigênio. Em que pressão parcial de oxigênio essa hemoglobina é semissaturada? Com base no aspecto dessa curva, a ligação ao oxigênio parece ser cooperativa?

(b) Construa um traçado de Hill utilizando esses dados. O traçado de Hill mostra alguma evidência de cooperatividade? Qual é o coeficiente de Hill?

(c) Estudos posteriores revelaram que a hemoglobina da lampreia forma oligômeros, principalmente dímeros, no estado desoxigenado. Proponha um modelo para explicar qualquer cooperatividade observada na ligação da hemoglobina da lampreia ao oxigênio.

15. *Inclinando-se para a esquerda ou para a direita.* A ilustração abaixo mostra várias curvas de dissociação do oxigênio. Suponha que a curva 3 corresponda à hemoglobina com concentrações fisiológicas de CO_2 e 2,3-BPG em pH 7. Que curvas representam cada uma das seguintes perturbações?

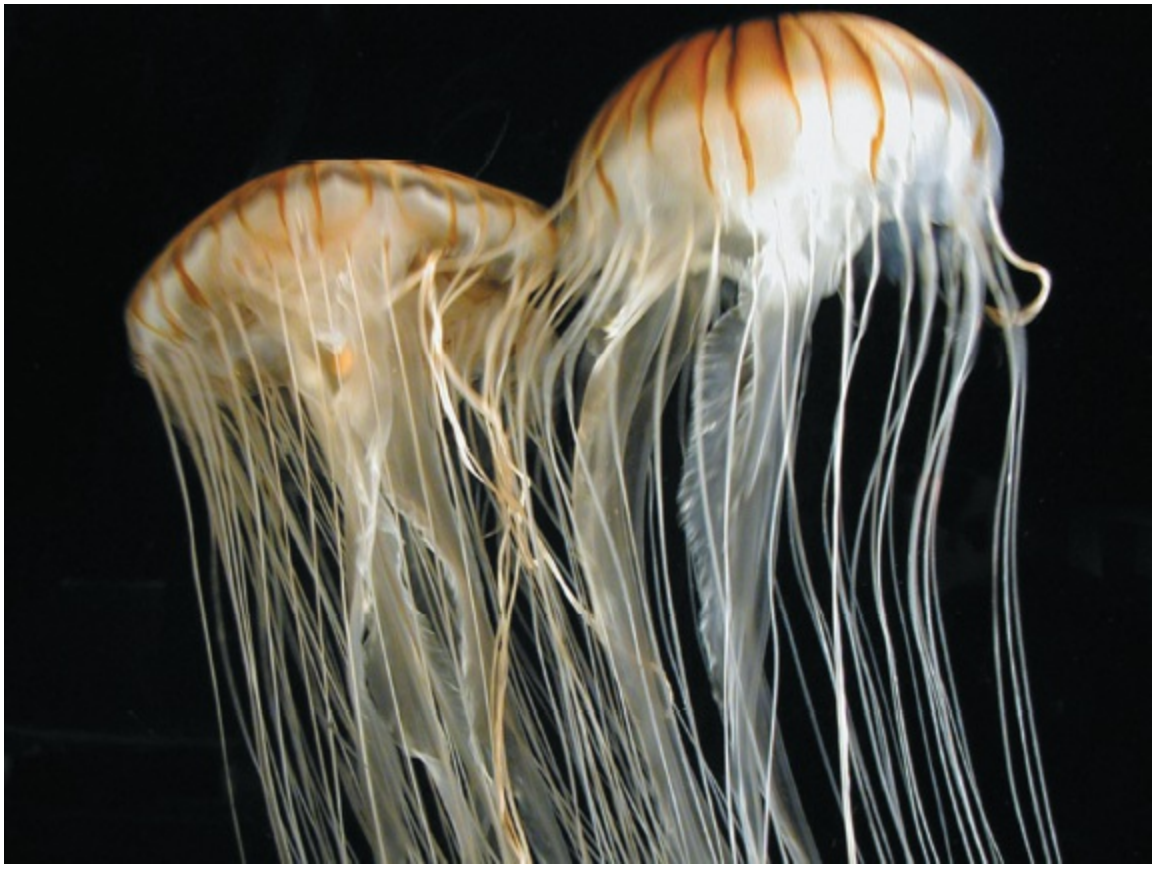


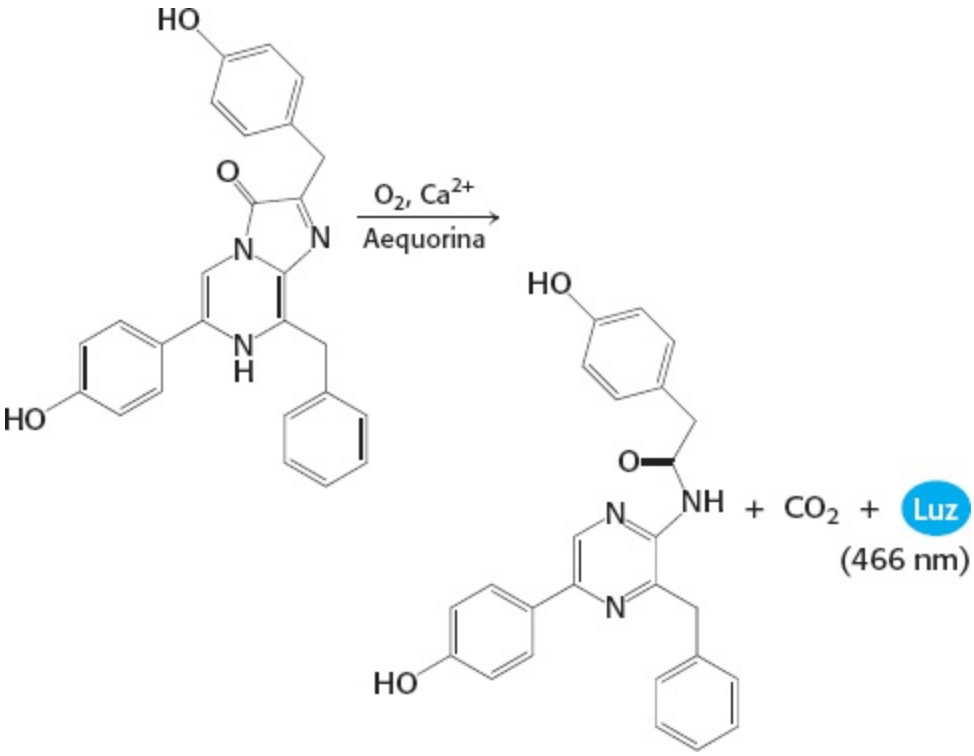
(a) Diminuição de CO_2 (c) Aumento do pH

(b) Aumento de 2,3-BPG (d) Perda da estrutura quaternária

Questão | Integração de capítulos

16. *A localização é tudo.* O 2,3-bifosfoglicerato localiza-se em uma cavidade central dentro do tetrâmero de hemoglobina, estabilizando o estado T. Qual seria o efeito de mutações que deslocassem o sítio de ligação do BPG para a superfície da hemoglobina?





A atividade de uma enzima é responsável pelo brilho da água-viva luminescente, à esquerda. A enzima aequorina catalisa a oxidação de um composto pelo oxigênio na presença de cálcio, liberando CO_2 e luz. [À esquerda, Lesya

Castillo/Featurepics.]

SUMÁRIO

8.1 As enzimas são catalisadores poderosos e altamente específicos

8.2 Aenergia livre é uma função termodinâmica útil para o entendimento das enzimas

8.3 As enzimas aceleram reações, facilitando a formação do estado de transição

8.4 Aequação de Michaelis-Menten descreve as propriedades cinéticas de muitas enzimas

8.5 As enzimas podem ser inibidas por moléculas específicas

8.6 As enzimas podem ser estudadas uma molécula de cada vez

As enzimas, que são os catalisadores dos sistemas biológicos, atuam como notáveis dispositivos moleculares, que determinam os padrões das transformações químicas. Elas também medeiam a transformação de uma forma de energia em outra. Cerca de 25% dos genes do genoma humano codificam enzimas, o que testemunha a sua importância para a vida. As características mais notáveis das enzimas consistem em seu *poder catalítico* e sua *especificidade.* A catálise ocorre em determinado local da enzima, denominado *sítio ativo.*

Quase todas as enzimas conhecidas são proteínas. Entretanto, as proteínas não têm o monopólio absoluto da catálise; a descoberta de moléculas de RNA cataliticamente ativas fornece evidências convincentes de que o RNA era um biocatalisador no início da evolução. As proteínas, como classe de macromoléculas, são catalisadores altamente efetivos para uma grande diversidade de reações químicas, em virtude de sua capacidade de *ligar-se especificamente a uma variedade muito ampla de moléculas.* Ao utilizar o repertório completo de forças intermoleculares, as enzimas aproximam os substratos em uma orientação ideal, que constitui o prelúdio para a formação e a quebra de ligações químicas. Elas catalisam reações *ao estabilizar os estados de transição,* as formas químicas de maior nível de energia nas vias das reações. Ao estabilizar seletivamente um estado de transição, uma enzima determina qual das várias reações químicas potenciais deve realmente ocorrer.

Tabela 8.1 Aumento da velocidade por enzimas selecionadas.

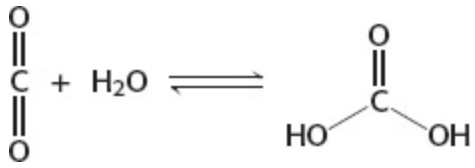
Enzima	Meia-vida não enzimática	Velocidade não catalisada (k_{un} s^{-1})	Velocidade catalisada (k_{cat} s^{-1})	Aumento da velocidade (k_{cat} $s{-}1/k_{un}$ s^{-1})
OMP descarboxilase	78.000.000 anos	$2{,}8 \times 10^{-16}$	39	$1{,}4 \times 10^{17}$
Nuclease estafilocócica	130.000 anos	$1{,}7 \times 10^{-13}$	95	$5{,}6 \times 10^{14}$
AMP nucleosidase	69.000 anos	$1{,}0 \times 10^{-11}$	60	$6{,}0 \times 10^{12}$
Carboxipeptidase A	7,3 anos	$3{,}0 \times 10^{-9}$	578	$1{,}9 \times 10^{11}$
Cetosteroide isomerase	7 semanas	$1{,}7 \times 10^{-7}$	66.000	$3{,}9 \times 10^{11}$
Triose fosfato isomerase	1,9 dia	$4{,}3 \times 10^{-6}$	4.300	$1{,}0 \times 10^{9}$
Corismato mutase	7,4 h	$2{,}6 \times 10^{-5}$	50	$1{,}9 \times 10^{6}$

Anidrase carbônica	5 segundos	$1{,}3 \times 10^{-1}$	1×10^{6}	$7{,}7 \times 10^{6}$

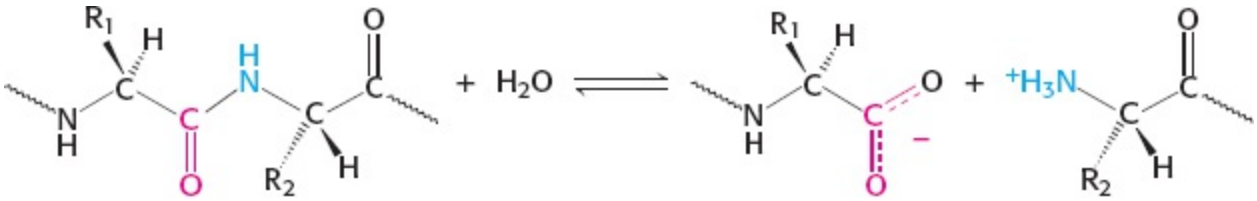
Abreviaturas: OMP, orotidina monofosfato; AMP, adenosina monofosfato.
Fonte: A. Radzicka e R. Wolfenden. *Science* 267:90-93, 1995.

8.1 As enzimas são catalisadores poderosos e altamente específicos

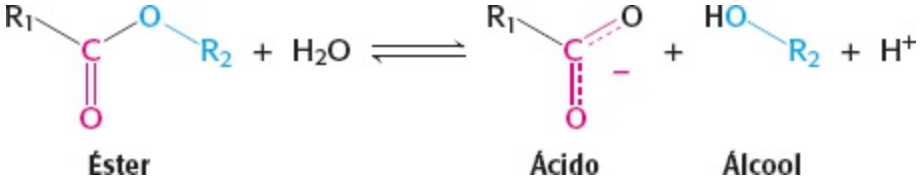
As *enzimas* aceleram as reações por fatores de até um milhão de vezes ou mais (Tabela 8.1). Com efeito, a maioria das reações nos sistemas biológicos não ocorre em velocidades perceptíveis na ausência de enzimas. Mesmo uma reação tão simples quanto a hidratação do dióxido de carbono é catalisada por uma enzima – isto é, a anidrase carbônica (Seção 9.2). A transferência de CO_2 dos tecidos para o sangue e, em seguida, para o ar nos alvéolos dos pulmões seria menos completa na ausência dessa enzima. De fato, a anidrase carbônica é uma das enzimas mais rápidas conhecidas. Cada molécula da enzima pode hidratar 10^6 moléculas de CO_2 *por segundo.* Essa reação catalisada é 10^7 vezes mais rápida do que a não catalisada. O mecanismo de catálise da anidrase carbônica será considerado no Capítulo 9.



As enzimas são altamente específicas tanto nas reações que catalisam quanto na sua escolha dos reagentes, que são denominados *substratos.* Uma enzima catalisa habitualmente uma única reação química ou um conjunto de reações estreitamente relacionadas. Consideraremos as *enzimas proteolíticas* como exemplo. *In vivo,* essas enzimas catalisam a *proteólise, isto é*, a hidrólise de uma ligação peptídica.



A maioria das enzimas proteolíticas também catalisa uma reação diferente, porém relacionada, *in vitro* – a saber, a hidrólise de uma ligação éster. Essas reações são mais facilmente monitoradas do que a proteólise e são úteis na investigação experimental dessas enzimas.



As enzimas proteolíticas diferem acentuadamente no seu grau de especificidade de substrato. A

papaína, que é encontrada no mamão, é pouco discriminativa: ela cliva qualquer ligação peptídica sem considerar praticamente a identidade das cadeias laterais adjacentes. Essa falta de especificidade responde pelo seu uso em molhos para amaciar a carne. Por outro lado, a tripsina, uma enzima digestiva, é muito específica e catalisa a clivagem de ligações peptídicas apenas no lado carboxílico dos resíduos de lisina e arginina (Figura 8.1A). A trombina, uma enzima que participa na coagulação do sangue, é ainda mais específica do que a tripsina. Ela catalisa apenas a hidrólise de ligações Arg-Gly em determinadas sequências peptídicas (Figura 8.1B).

A DNA polimerase I, uma enzima dirigida pelo molde (Seção 28.3), é outro catalisador altamente específico. Na fita de DNA em processo de síntese, a DNA polimerase adiciona nucleotídios em uma sequência determinada pela sequência dos nucleotídios em outra fita de DNA que serve como molde. A DNA polimerase I é notavelmente precisa na execução das instruções fornecidas pelo molde. Ela insere um nucleotídio errado em uma nova fita de DNA menos de uma em mil vezes. *A especificidade de uma enzima deve-se à interação precisa do substrato com a enzima. Essa precisão é o resultado da complexa estrutura tridimensional da proteína enzimática.*

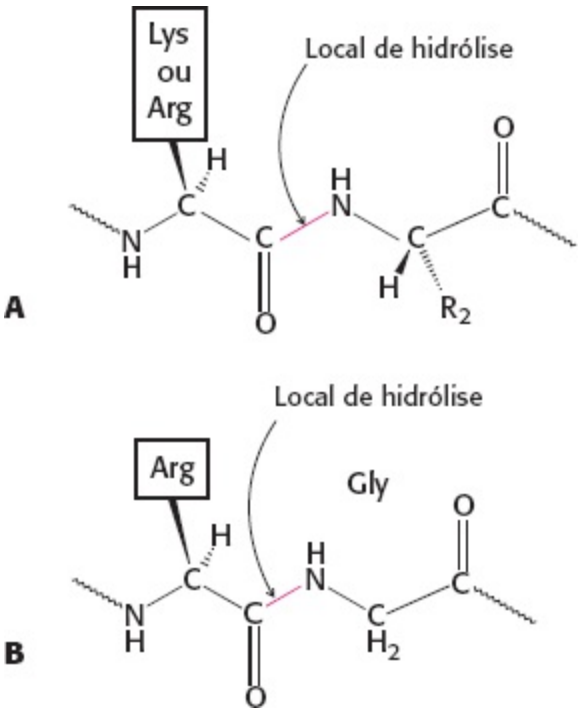


Figura 8.1 Especificidade enzimática. A A tripsina efetua a clivagem no lado carboxílico dos resíduos de arginina e lisina, enquanto (**B**) a trombina cliva ligações Arg-Gly somente em determinadas sequências.

Muitas enzimas necessitam de cofatores para a sua atividade

A atividade catalítica de muitas enzimas depende da presença de pequenas moléculas, denominadas *cofatores,* embora o seu papel exato varie com o cofator e a enzima. Em geral, esses cofatores são capazes de executar reações químicas que não podem ocorrer pelo conjunto padrão de vinte aminoácidos. Uma enzima sem o seu cofator é designada como *apoenzima*; a enzima completa e cataliticamente ativa é denominada *holoenzima.*

$$\text{Apoenzima} + \text{cofator} = \text{holoenzima}$$

Os cofatores podem ser subdivididos em dois grupos: (1) metais e (2) pequenas moléculas orgânicas, denominadas *coenzimas* (Tabela 8.2). As coenzimas, que frequentemente derivam de vitaminas,

podem ligar-se à enzima firmemente ou frouxamente. As coenzimas ligadas firmemente são denominadas *grupos prostéticos*. As coenzimas associadas frouxamente são mais semelhantes a cossubstratos, visto que, do mesmo modo que os substratos e produtos, elas se ligam à enzima e são liberadas dela. Entretanto, o uso da mesma coenzima por uma variedade de enzimas as diferencia dos substratos normais, assim como a sua origem nas vitaminas (Seção 15.4). As enzimas que utilizam a mesma coenzima efetuam habitualmente a catálise por mecanismos semelhantes. No Capítulo 9, examinaremos a importância dos metais para a atividade enzimática e, em todo o livro, veremos como as coenzimas e seus parceiros, as enzimas, operam em seu contexto bioquímico.

Tabela 8.2 Cofatores de enzimas.

Cofator	Enzima
Coenzima	
Tiamina pirofosfato	Piruvato desidrogenase
Flavina adenina nucleotídio	Monoamina oxidase
Nicotinamida adenina dinucleotídio	Lactato desidrogenase
Piridoxal fosfato	Glicogênio fosforilase
Coenzima A (CoA)	Acetil-CoA carboxilase
Biotina	Piruvato carboxilase
5′-desoxiadenosil cobalamina	Metilmalonil mutase
Tetra-hidrofolato	Timidilato sintase
Metal	
Zn^{2+}	Anidrase carbônica
Zn^{2+}	Carboxipeptidase
Mg^{2+}	*Eco*RV
Mg^{2+}	Hexoquinase
Ni^{2+}	Urease
Mo	Nitrato redutase
Se	Glutationa peroxidase
Mn	Superóxido dismutase
K^{+}	Propionil–CoA carboxilase

As enzimas podem transformar a energia de uma forma para outra

Uma atividade essencial observada em todos os sistemas vivos consiste na capacidade de converter uma forma de energia em outra. Por exemplo, na fotossíntese, a energia luminosa é convertida em energia química de ligação. Na respiração celular, que ocorre nas mitocôndrias, a energia livre contida em pequenas moléculas provenientes do alimento é transformada inicialmente na energia livre de um gradiente iônico e, a seguir, em uma moeda corrente diferente – a energia livre da adenosina trifosfato. Em virtude de seu papel central na vida, não é surpreendente que as enzimas desempenhem funções vitais na transformação da energia. Como veremos adiante, as enzimas são fundamentais no processo de fotossíntese e na respiração celular. Outras enzimas podem então utilizar a energia das ligações químicas do ATP de diversas maneiras. Por exemplo, a enzima miosina converte a energia do ATP na energia mecânica da contração muscular (Capítulo 35). As bombas, nas membranas das células e das organelas, que podem ser consideradas enzimas que movem substratos, em lugar de alterá-los quimicamente, utilizam a energia do ATP para transportar moléculas e íons através da membrana (Capítulo 13). Os gradientes químicos e elétricos que resultam da distribuição desigual dessas moléculas e íons são, eles próprios, formas de energia que podem ser usadas com vários propósitos, como a transmissão de impulsos nervosos.

Os mecanismos moleculares dessas enzimas de transdução de energia estão sendo elucidados. Em capítulos posteriores, veremos como ciclos unidirecionais de etapas individuais – ligação, transformação química e liberação – levam à conversão de um tipo de energia em outro.

8.2 A energia livre é uma função termodinâmica útil para o entendimento das enzimas

As enzimas aceleram a velocidade das reações químicas, porém as propriedades da reação – se ela pode ou não ocorrer e o grau com que a enzima acelera a reação – dependem das diferenças de energia entre os reagentes e os produtos. A *energia livre (G),* que foi introduzida no Capítulo 1, é uma propriedade termodinâmica que mede a energia útil ou energia capaz de realizar um trabalho. Para compreender como as enzimas operam, precisamos considerar apenas duas propriedades termodinâmicas da reação: (1) a diferença de energia livre (ΔG) entre os produtos e os reagentes e (2) a energia necessária para iniciar a conversão dos reagentes em produtos. A primeira determina se a reação irá ocorrer de modo espontâneo, enquanto a segunda determina a velocidade da reação. As enzimas afetam apenas esta última propriedade. Iremos rever alguns dos princípios de termodinâmica à medida que se aplicam às enzimas.

A variação de energia livre fornece informações acerca da espontaneidade de uma reação, mas não de sua velocidade

Conforme discutido no Capítulo 1, a variação de energia livre de uma reação (ΔG) nos diz se ela pode ocorrer espontaneamente:

1. *Uma reação só pode ocorrer espontaneamente se G for negativo.* Essas reações são denominadas *exergônicas*.

2. Um sistema está em equilíbrio e não pode ocorrer nenhuma mudança *efetiva* se ΔG for igual a zero.

3. Uma reação não pode ocorrer espontaneamente se ΔG for positivo. É necessária uma entrada de energia livre para acionar esse tipo de reação. Essas reações são denominadas *endergônicas.*

4. ΔG de uma reação depende apenas da energia livre dos produtos (o estado final) menos a energia livre dos reagentes (o estado inicial). ΔG *de uma reação é independente da via (ou do mecanismo molecular) da transformação.* O mecanismo de uma reação não exerce nenhum efeito sobre ΔG. Por exemplo, ΔG para a oxidação da glicose a CO_2 e H_2O é a mesma, independentemente de ela ocorrer por combustão ou por uma série de etapas catalisadas por enzimas em uma célula.

5. ΔG *não fornece nenhuma informação sobre a velocidade de uma reação.* Um ΔG negativo indica que a reação *pode* ocorrer de modo espontâneo, mas não significa que ela irá ocorrer em uma velocidade perceptível. Conforme discutido adiante (Seção 8.3), a velocidade de uma reação depende da *energia livre de ativação* ($\Delta G^{\ddagger}$), que, em grande parte, não está relacionada com ΔG da reação.

A variação padrão de energia livre de uma reação está relacionada com a constante de equilíbrio

Como para qualquer reação, precisamos ser capazes de determinar ΔG para uma reação catalisada enzimaticamente, a fim de saber se a reação é espontânea ou se necessita de uma entrada de energia. Para determinar esse importante parâmetro termodinâmico, precisamos levar em consideração a natureza dos reagentes e dos produtos, bem como as suas concentrações.

Consideremos a seguinte reação

$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

ΔG desta reação é dada por

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \qquad (1)$$

em que ΔG^{o} é a *variação padrão de energia livre, R* é a constante universal dos gases, *T* é a temperatura absoluta, e [A], [B], [C] e [D] são as concentrações molares (mais precisamente, as atividades) dos reagentes. ΔG^{o} é a variação de energia livre para esta reação em condições padrões – isto é, quando cada um dos reagentes A, B, C e D está presente em uma concentração de 1,0 M (para um gás, o estado padrão é habitualmente escolhido como uma (1) atmosfera). Por conseguinte, ΔG de uma reação depende da *natureza* dos reagentes (expressa no termo ΔG^{o} da equação 1) e de suas *concentrações* (expressas pelo termo logarítmico da equação 1).

Foi adotada uma convenção para simplificar os cálculos de energia livre para as reações bioquímicas. O estado padrão é definido por ter um pH de 7. Em consequência, quando o H^{+} é um reagente, a sua atividade tem o valor 1 (correspondendo a um pH de 7) nas equações 1 e 3 (adiante). A atividade da água também é considerada como 1 nessas equações. A *variação padrão de energia livre em pH 7*, designada pelo símbolo $\Delta G^{o'}$, será usada em todo o livro. O *quilojoule (*abreviado *kJ*) e a *quilocaloria (kcal)* serão usados como as unidades de energia. Um quilojoule equivale a 0,239

quilocaloria.

Unidades de energia

Um *quilojoule* (kJ) é igual a 1.000 J.

Um *joule* (J) é a quantidade de energia necessária para aplicar uma força de 1 newton pela distância de 1 metro.

Uma *quilocaloria* (kcal) é igual a 1.000 cal.

Uma *caloria* (cal) é equivalente à quantidade de calor necessária para elevar a temperatura de 1 grama de água de 14,5°C para 15,5°C.

1 kJ = 0,239 kcal.

Uma maneira simples de determinar $\Delta G^{o'}$ consiste em medir as concentrações dos reagentes e dos produtos quando a reação alcança o equilíbrio. No equilíbrio, não existe nenhuma variação efetiva nos reagentes e produtos; em essência, a reação está interrompida, e $\Delta G = 0$. Em equilíbrio, a equação 1 torna-se então

$$0 = \Delta G^{\circ\prime} + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \qquad (2)$$

e, portanto

$$\Delta G^{\circ\prime} = -RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \qquad (3)$$

A constante de equilíbrio em condições padrões, K'_{eq}, é definida como

$$K'_{eq} = \frac{[C][D]}{[A][B]} \qquad (4)$$

Aplicando a equação 4 na equação 3, temos

$$\Delta G^{\circ\prime} = -RT \ln K'_{eq} \qquad (5)$$

que pode ser reorganizada para dar

$$K'_{eq} = 10^{-\Delta G^{\circ\prime}/RT} \qquad (6)$$

Substituindo $R = 8{,}315 \times 10^{-3}$ kJ mol^{-1} deg^{-1} e $T = 298$ K (que corresponde a 25°C), temos

$$K'_{eq} = 10^{-\Delta G^{\circ\prime}/2{,}47} \qquad (7)$$

Em que $\Delta G^{o'}$ é aqui expresso em quilojoules por mol, devido à escolha das unidades para R na equação 7. Por conseguinte, a energia livre padrão e a constante de equilíbrio de uma reação estão relacionadas por uma expressão simples. Por exemplo, uma constante de equilíbrio de 10 fornece uma variação padrão de energia livre de –5,69 kJ mol^{-1} (–1,36 kcal mol^{-1}) a 25°C (Tabela 8.3). Observe que, para cada variação de 10 vezes na constante de equilíbrio, $\Delta G^{o'}$ varia 5,69 kJ mol^{-1} (1,36 kcal mol^{-1}).

Tabela 8.3 Relação entre $\Delta G^{o'}$ e K'_{eq} (a 25°C).

	$\Delta Go'$	
K'_{eq}	kJ mol_{-1}	kcal mol_{-1}
10^{-5}	28,53	6,82
10^{-4}	22,84	5,46
10^{-3}	17,11	4,09
10^{-2}	11,42	2,73
10^{-1}	5,69	1,36
1	0,00	0,00
10	−5,69	−1,36
10^2	−11,42	−2,73
10^3	−17,11	−4,09
10^4	−22,84	−5,46
10^5	−28,53	−6,82

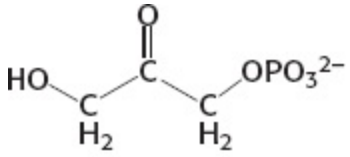
Como exemplo, calculemos $\Delta G^{o'}$ e ΔG para a isomerização da di-hidroxiacetona fosfato (DHAP) em gliceraldeído 3-fosfato (GAP). Essa reação ocorre na glicólise (Capítulo 16). No equilíbrio, a razão entre GAP e DHAP é de 0,0475 a 25°C (298 K) e pH 7. Por conseguinte, $K'_{eq} = 0{,}0475$. A variação padrão de energia livre para essa reação é então calculada pela equação 5:

$$\Delta G^{o'} = -RT \ln K' \text{ eq}$$
$$= -8{,}315 \times 10^{-3} \times 298 \times \ln (0{,}0475)$$
$$= +7{,}53 \text{ kJ mol}^{-1} (+1{,}80 \text{ kcal mol}^{-1})$$

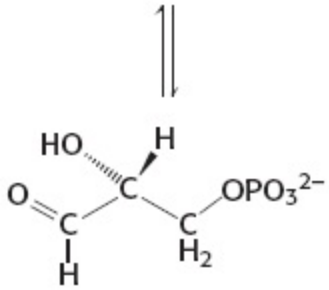
Nessas condições, a reação é endergônica. O DHAP não é convertido espontaneamente em GAP.

Calculemoss agora ΔG para essa reação, quando a concentração inicial de DHAP é de 2×10^{-4} M, e a concentração inicial de GAP é de 3×10^{-6} M. Substituindo esses valores na equação 1, temos

$$\Delta G = 7{,}53 \text{ kJ mol}^{-1} + RT \ln \frac{3 \times 10^{-6} \text{ M}}{2 \times 10^{-4} \text{ M}}$$
$$= 7{,}53 \text{ kJ mol}^{-1} - 10{,}42 \text{ kJ mol}^{-1}$$
$$= -2{,}89 \text{ kJ mol}^{-1} (-0{,}69 \text{ kcal mol}^{-1})$$



Di-hidroxiacetona fosfato (DHAP)



Gliceraldeído 3-fosfato (GAP)

Esse valor negativo para ΔG indica que a isomerização de DHAP a GAP é exergônica e pode ocorrer espontaneamente quando essas espécies estiverem presentes nas concentrações precedentes. Observe que ΔG para essa reação é negativo, embora $\Delta G^{o'}$ seja positivo. *É importante ressaltar que o fato de* ΔG para uma reação ser maior, menor ou igual a $\Delta G^{o'}$ *depende das concentrações dos reagentes e dos produtos.* O critério de espontaneidade para uma reação é ΔG, e não $\Delta G^{o'}$. Esse aspecto é importante, visto que as reações que não são espontâneas com base em $\Delta G^{o'}$ podem tornar-se espontâneas pelo ajuste das concentrações dos reagentes e produtos. Esse princípio constitui a base do acoplamento das reações na formação das vias metabólicas (Capítulo 15).

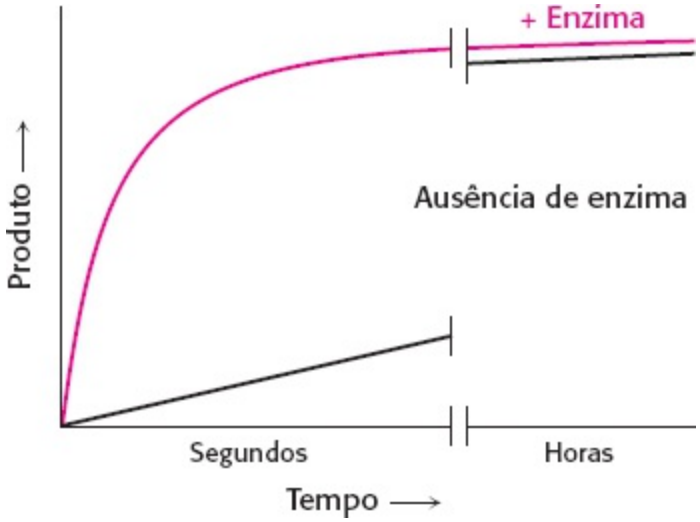


Figura 8.2 As enzimas aceleram a velocidade da reação. O mesmo ponto de equilíbrio é alcançado, porém muito mais rapidamente na presença de uma enzima.

As enzimas só alteram a velocidade da reação, e não o seu equilíbrio

Como as enzimas são catalisadores extraordinários, é tentador atribuir-lhes poderes que elas não têm. Uma enzima não pode alterar as leis da termodinâmica e, *em consequência, não pode alterar o equilíbrio de uma reação química.* Consideremos uma reação catalisada enzimaticamente, a conversão do substrato S em produto P. A Figura 8.2 mostra a velocidade de formação do produto no

tempo, na presença e na ausência de enzima. Observe que a quantidade de produto formado é a mesma, na presença ou na ausência da enzima; todavia, neste exemplo, a quantidade de produto formado em segundos quando a enzima está presente poderia levar horas (ou séculos, veja Tabela 8.1) para se formar se a enzima estivesse ausente.

Por que a velocidade da formação de produto se estabiliza com o passar do tempo? A reação alcançou o equilíbrio. O substrato S ainda está sendo convertido em produto P, porém P está sendo convertido em S em uma velocidade que faz com que a quantidade de P presente permaneça a mesma.

Examinemos o equilíbrio de uma maneira mais quantitativa. Suponhamos que, na ausência de enzima, a constante de velocidade da reação direta (k_F), para a conversão de S em P, seja de 10^{-4} s^{-1}, e a constante de velocidade da reação reversa (k_R), para a conversão de P em S, seja de 10^{-6} s^{-1}. A constante de equilíbrio K é dada pela razão entre essas constantes de velocidade:

$$S \underset{10^{-6}\ s^{-1}}{\overset{10^{-4}\ s^{-1}}{\rightleftharpoons}} P$$

$$K = \frac{[P]}{[S]} = \frac{k_F}{k_R} = \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100$$

A concentração de P no equilíbrio é 100 vezes a de S, esteja ou não presente uma enzima. Todavia, poderia ser necessário um tempo muito longo para alcançar esse equilíbrio na ausência de enzima, ao passo que o equilíbrio seria alcançado rapidamente na presença de uma enzima apropriada (ver Tabela 8.1). *As enzimas aceleram a obtenção do equilíbrio, mas não deslocam a sua posição. A posição de equilíbrio é uma função apenas da diferença e energia livre entre reagentes e produtos.*

8.3 As enzimas aceleram reações, facilitando a formação do estado de transição

A diferença de energia livre entre reagentes e produtos explica o equilíbrio da reação, porém as enzimas aceleram a velocidade com que esse equilíbrio é alcançado. Como podemos explicar o aumento de velocidade em termos termodinâmicos? Para fazê-lo, precisamos considerar não os pontos finais da reação, mas a via química entre os pontos finais.

Uma reação química do substrato S para formar o produto P passa por um *estado de transição* $X^{\ddagger}$ que apresenta uma energia livre mais alta do que S ou P.

$$S \longrightarrow X^{\ddagger} \longrightarrow P$$

A dupla cruz denota o estado de transição. Esse estado é uma estrutura molecular transitória, que não é mais o substrato, mas que ainda não é o produto. O estado de transição é a forma menos estável e mais raramente ocupada ao longo da via da reação, visto que é a que apresenta a energia livre mais alta. A diferença de energia livre entre o estado de transição e o substrato é denominada *energia livre de ativação de Gibbs* ou, simplesmente, *energia de ativação*, simbolizada por $\Delta G^{\ddagger}$ (Figura 8.3).

$$\Delta G^{\ddagger} = G_{X}{}^{\ddagger} - G_S$$

Observe que a energia de ativação ou $\Delta G^{\ddagger}$ não entra no cálculo final de ΔG para a reação, visto que a energia necessária para gerar o estado de transição é liberada quando o estado de transição forma o produto. A barreira de energia de ativação sugere imediatamente como uma enzima aumenta a velocidade da reação sem alterar ΔG da reação: as enzimas atuam para diminuir a energia de ativação ou, em outras palavras, *as enzimas facilitam a formação do estado de transição.*

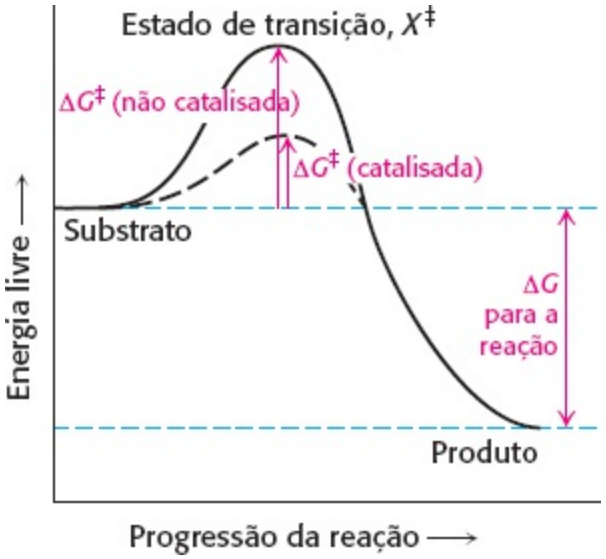


Figura 8.3 As enzimas diminuem a energia de ativação. As enzimas aceleram as reações ao diminuírem $\Delta G^{\ddagger}$, a energia livre de ativação.

Uma abordagem para compreender o aumento da velocidade de reação obtido pelas enzimas consiste em supor que o estado de transição ($X^{\ddagger}$) e o substrato (S) estejam em equilíbrio.

$$S \overset{K^{\ddagger}}{\rightleftharpoons} X^{\ddagger} \xrightarrow{v} P$$

em que $K^{\ddagger}$ é a constante de equilíbrio para a formação de $X^{\ddagger}$, e v é a velocidade de formação do produto a partir do $X^{\ddagger}$. A velocidade da reação v é proporcional à concentração de $X^{\ddagger}$,

$$v \propto [X^{\ddagger}],$$

visto que apenas o $X^{\ddagger}$ pode ser convertido em produto. Por sua vez, a concentração de $X^{\ddagger}$ em equilíbrio está relacionada com a diferença de energia livre, $\Delta G^{\ddagger}$, entre $X^{\ddagger}$ e S; quanto maior a diferença de energia livre entre esses dois estados, menor a quantidade de $X^{\ddagger}$. Por conseguinte, a velocidade global da reação V depende da $\Delta G^{\ddagger}$. Especificamente,

$$V = v[X^{\ddagger}] = \frac{kT}{h}[S]e^{-\Delta G^{\ddagger}/RT}$$

Nesta equação, k é a constante de Boltzmann, e h é a constante de Planck. O valor de kT/h a 25°C é de $6{,}6 \times 10^{12}$ s^{-1}. Suponhamos que a energia livre de ativação seja de 28,53 kJ mol^{-1} (6,82 kcal mol^{-1}). Se formos aplicar esse valor de ΔG na equação 7 (como mostra a Tabela 8.3), essa diferença de energia livre irá ocorrer quando a razão $[X^{\ddagger}]/[S]$ for 10^{-5}. Se supusermos, para maior simplicidade, que [S] = 1 M, então a velocidade da reação V é de $6{,}2 \times 10^{7}$ s^{-1}. Se $\Delta G^{\ddagger}$ fosse reduzida em 5,69 kJ

mol^{-1} (1,36 kcal mol^{-1}), a razão $[X^{\ddagger}]/[S]$ seria então de 10^{-4}, e a velocidade da reação seria de $6,2 \times 10^8$ s^{-1}. Uma diminuição de 5,69 kJ mol^{-1} em $\Delta G^{\ddagger}$ resulta em uma V 10 vezes maior. Uma diminuição relativamente pequena de $\Delta G^{\ddagger}$ (20% nesta reação em particular) resulta em um aumento muito maior de V.

Por conseguinte, vemos o mecanismo pelo qual as enzimas operam: *as enzimas aceleram as reações ao diminuir* $\Delta G^{\ddagger}$, *a energia de ativação.* A combinação do substrato com a enzima cria uma via de reação, em que a energia do estado de transição é mais baixa que a da reação na ausência da enzima (Figura 8.3). Como a energia de ativação é menor, um maior número de moléculas apresenta a energia necessária para alcançar o estado de transição. A diminuição da barreira de ativação é análoga ao abaixamento de uma barra de salto em altura; mais atletas serão capazes de passar por cima dela. *A essência da catálise é a estabilização do estado de transição.*

"Penso que as enzimas são moléculas cuja estrutura é complementar aos complexos ativados das reações que elas catalisam, isto é, à configuração molecular intermediária entre as substâncias reagentes e os produtos da reação para esses processos catalisados. A atração da molécula de enzima pelo complexo ativado levaria, assim, a uma redução de sua energia e, portanto, a uma diminuição da energia de ativação da reação e a um aumento de sua velocidade."

—Linus Pauling

Nature 161:707, 1948

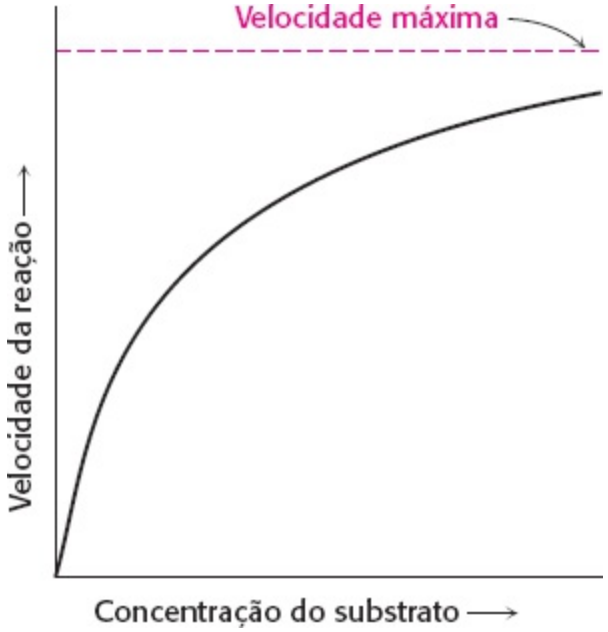


Figura 8.4 Velocidade de reação *versus* concentração de substrato em uma reação catalisada por enzima. Uma reação catalisada por enzima aproxima-se de uma velocidade máxima.

A formação de um complexo enzima-substrato constitui a primeira etapa na catálise enzimática

Grande parte do poder catalítico das enzimas provém de sua capacidade de organizar os substratos em orientações favoráveis para promover a formação dos estados de transição. As enzimas reúnem os substratos em complexos de *enzima-substrato* (ES). Os substratos ligam-se a uma região específica da enzima, denominada *sítio ativo.* As enzimas são, em sua maioria, altamente seletivas na sua ligação aos substratos. Com efeito, a especificidade catalítica das enzimas depende, em parte, da

especificidade de ligação.

Quais são as evidências para a existência de um complexo enzima-substrato?

1. A primeira pista foi a observação de que, em uma concentração constante de enzima, a velocidade da reação aumenta com a concentração crescente de substrato até alcançar uma velocidade máxima (Figura 8.4). Em contrapartida, as reações não catalisadas não exibem esse efeito de saturação. *O fato de que uma reação catalisada por enzima tenha uma velocidade máxima sugere a formação de um complexo ES distinto.* Em uma concentração de substrato suficientemente alta, todos os sítios catalíticos são ocupados ou saturados, de modo que a velocidade da reação não pode aumentar. Apesar de indireta, a capacidade de saturar uma enzima com substrato constitui a evidência mais geral da existência de complexos ES.

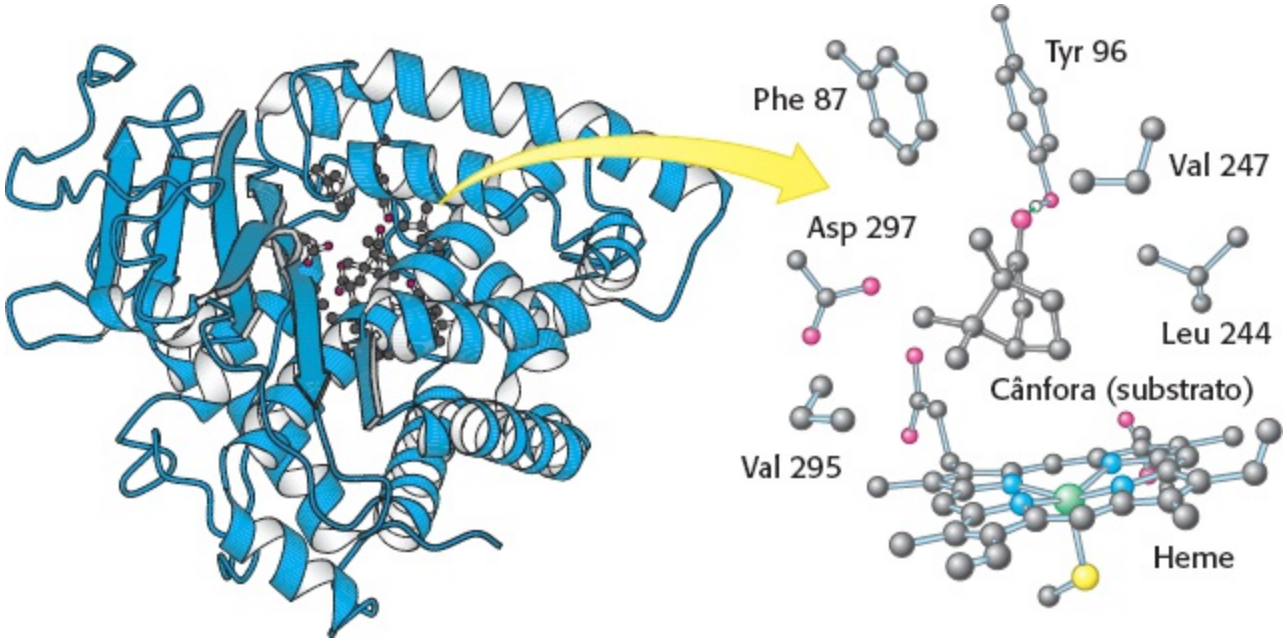


Figura 8.5 Estrutura de um complexo enzima-substrato. À esquerda, a enzima citocromo P450 é ilustrada ligada a seu substrato, a cânfora. À direita, *observe* que, no sítio ativo, o substrato é circundado por resíduos da enzima. Observe também a presença de um cofator heme. [Desenhada a partir de 2CPP. pdb.]

2. *A cristalografia de raios X* tem fornecido imagens de alta resolução de substratos e análogos de substratos ligados aos sítios ativos de muitas enzimas (Figura 8.5). No Capítulo 9, iremos analisar mais detalhadamente vários desses complexos.

3. As *características espectroscópicas* de muitas enzimas e substratos mudam com a formação de um complexo ES. Essas mudanças são particularmente notáveis quando a enzima contém um grupo prostético colorido (ver Questão 31).

Os sítios ativos das enzimas apresentam algumas características em comum

O *sítio ativo* de uma enzima é a região que se liga aos substratos (e ao cofator, se houver algum). Além disso, contém os resíduos que participam diretamente na produção e na quebra de ligações. Esses resíduos são denominados *grupos catalíticos*. Em essência, *a interação da enzima com o substrato no sítio ativo promove a formação do estado de transição.* O sítio ativo é a região da enzima que diminui mais diretamente $\Delta G^{\ddagger}$ da reação, proporcionando, assim, o aumento de

velocidade característico da ação da enzima. Apesar de as enzimas diferirem amplamente na sua estrutura, especificidade e modo de catálise, podem ser feitas várias generalizações no que concerne a seus sítios ativos:

1. *O sítio ativo é uma fenda ou cavidade tridimensional* formada por grupos que provêm de diferentes partes da sequência de aminoácidos: na verdade, resíduos bem distantes na sequência de aminoácidos podem interagir mais fortemente do que os resíduos adjacentes na sequência, que podem ser estericamente impedidos de interagir uns com os outros. Na lisozima, uma enzima que degrada as paredes celulares de algumas bactérias, os grupos importantes no sítio ativo são proporcionados pelos resíduos 35, 52, 62, 63, 101 e 108 da sequência de 129 aminoácidos (Figura 8.6).

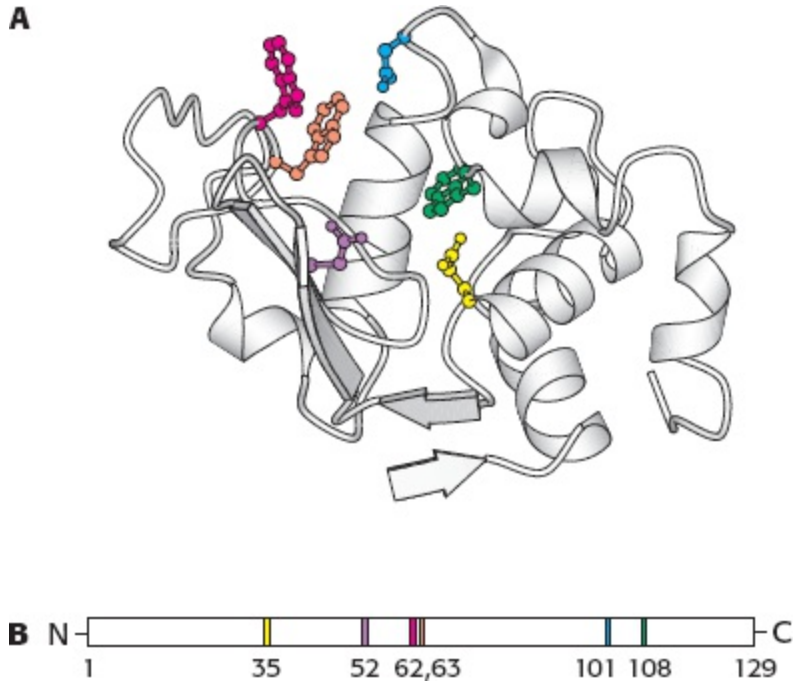


Figura 8.6 Os sítios ativos podem incluir resíduos distantes. A. Diagrama em fitas da enzima lisozima, com vários componentes do sítio ativo mostrados em cores. **B.** Representação esquemática da estrutura primária da lisozima, mostrando que o sítio ativo é composto de resíduos que provêm de diferentes partes da cadeia polipeptídica. [Desenhada a partir de 6LYZ.pdb.]

2. *O sítio ativo ocupa uma pequena parte do volume total de uma enzima.* A maioria dos resíduos de aminoácidos de uma enzima não está em contato com o substrato, o que levanta a questão desafiadora de porque as enzimas são tão grandes. Quase todas as enzimas são constituídas de mais de 100 resíduos de aminoácidos, o que lhes confere uma massa acima de 10 kDa e um diâmetro de mais de 25 Å. Os aminoácidos "extras" servem de andaime para criar o sítio ativo tridimensional. Em muitas proteínas, os aminoácidos remanescentes também constituem sítios regulatórios, sítios de interação com outras proteínas ou canais para trazer os substratos até os sítios ativos.

3. *Os sítios ativos são microambientes singulares.* Em todas as enzimas de estrutura conhecida, os sítios ativos têm uma forma semelhante a uma fenda ou cavidade, à qual os substratos se ligam. A água é habitualmente excluída, a não ser que ela seja um reagente. O microambiente apolar da fenda aumenta a ligação dos substratos, bem como a catálise. Todavia, a fenda também pode conter resíduos polares. No microambiente apolar do sítio ativo, alguns desses resíduos polares adquirem propriedades especiais, que são essenciais para a ligação do substrato ou a catálise. As posições

internas desses resíduos polares constituem exceções biologicamente cruciais à regra geral de que os resíduos polares são expostos à água.

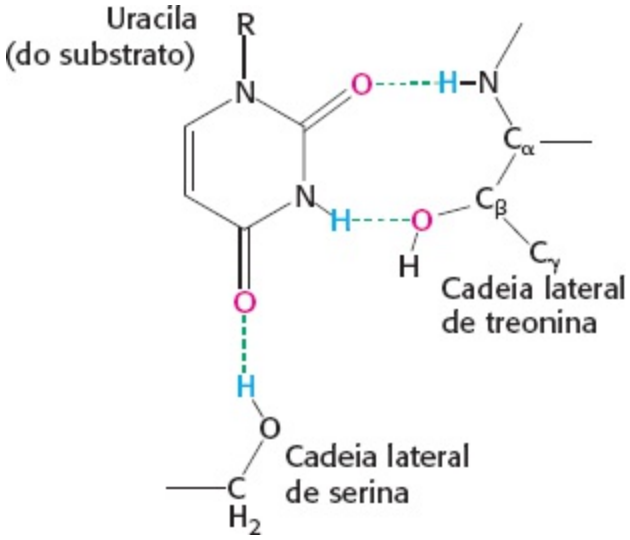


Figura 8.7 Pontes de hidrogênio entre uma enzima e o seu substrato. A enzima ribonuclease forma pontes de hidrogênio com o componente uridina do substrato. [Segundo F. M. Richards, H. W. Wyckoff and N. Allewell. In: *The Neurosciences: Second Study Programa,* F. O. Schmidt, Ed. (Rockefeller University Press, 1970), p. 970.]

4. *Os substratos estão ligados às enzimas por múltiplas atrações fracas.* As interações não covalentes nos complexos ES são muito mais fracas do que as ligações covalentes, que apresentam energias entre –210 e –460 kJ mol^{-1} (entre –50 e –110 kcal mol^{-1}). Em contrapartida, os complexos ES têm habitualmente constantes de equilíbrio que variam de 10^{-2} a 10^{-8} M, correspondendo a energias livres de interação, que variam de cerca de –13 a –50 kJ mol^{-1} (de –3 a –12 kcal mol^{-1}). Conforme discutido na Seção 1.3, essas interações reversíveis fracas são mediadas por interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e forças de van der Waals. As forças de van der Waals só se tornam significativas na ligação quando numerosos átomos do substrato aproximam-se simultaneamente de muitos átomos da enzima através do efeito hidrofóbico. Por conseguinte, a enzima e o substrato devem ter formas complementares. O caráter direcional das pontes de hidrogênio entre a enzima e o substrato frequentemente reforça um alto grau de especificidade, conforme observado na ribonuclease, a enzima que degrada o RNA (Figura 8.7).

5. *A especificidade de ligação depende do arranjo precisamente definido de átomos no sítio ativo.* Como a enzima e o substrato interagem por meio de forças de curta amplitude, que necessitam de um contato estreito, é necessário que o substrato tenha um formato correspondente à enzima para se adaptar ao local de interação com a enzima. Emil Fischer propôs a analogia da chave e fechadura em 1890 (Figura 8.8), que constituiu o modelo para a interação enzima-substrato durante várias décadas. Todavia, hoje em dia, sabemos que as enzimas são flexíveis, e que as formas dos sítios ativos podem ser acentuadamente modificadas pela ligação do substrato, como foi postulado por Daniel E. Koshland, Jr., em 1958. O sítio ativo de algumas enzimas assume um formato que é complementar ao do substrato apenas *após* a ligação do substrato. Esse processo de reconhecimento dinâmico é denominado *encaixe induzido* (Figura 8.9).

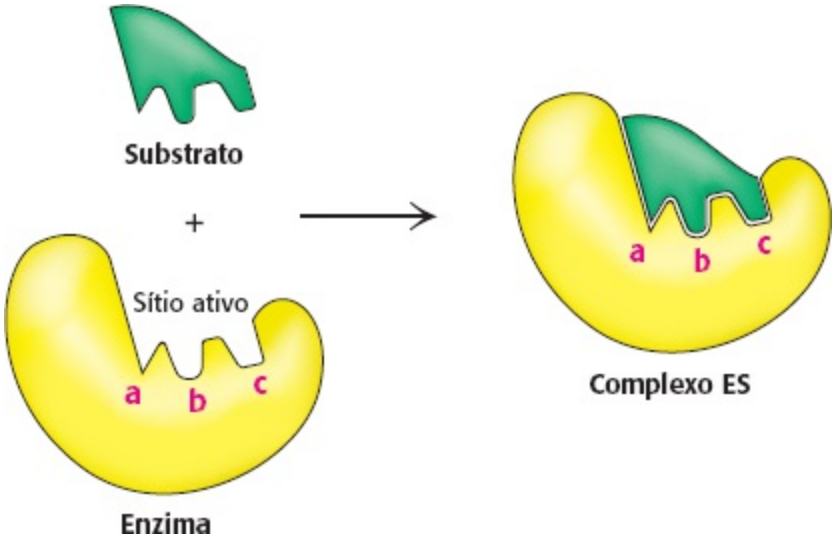


Figura 8.8 Modelo de chave e fechadura da ligação enzima-substrato. Neste modelo, o sítio ativo da enzima não ligada tem um formato complementar ao do substrato.

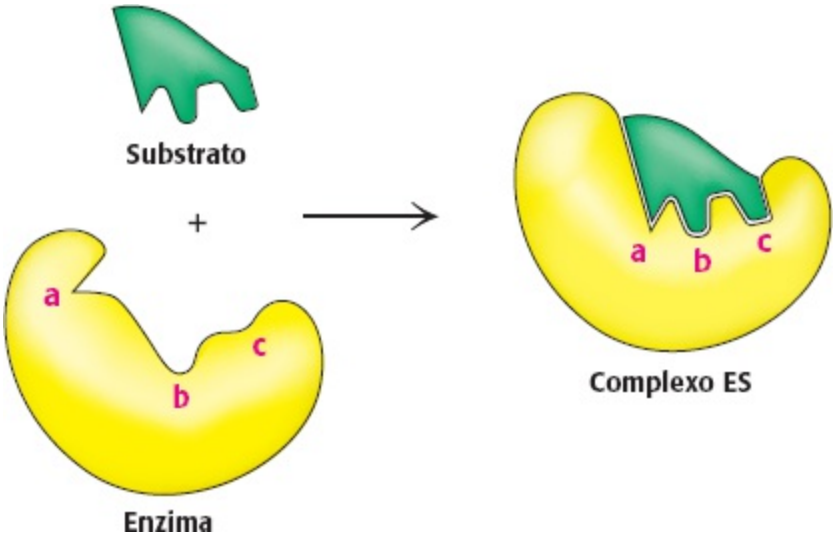


Figura 8.9 Modelo de encaixe induzido da ligação enzima-substrato. Neste modelo, a enzima muda de formato com a ligação do substrato. O sítio ativo apresenta um formato complementar ao do substrato somente após a ligação do substrato.

A energia de ligação entre a enzima e o substrato é importante para a catálise

As enzimas reduzem a energia de ativação, porém de onde provém a energia para reduzir a energia de ativação? A energia livre é liberada pela formação de um grande número de interações fracas entre uma enzima complementar e seu substrato. A energia livre liberada na ligação é denominada *energia de ligação*. Somente o substrato correto pode participar na maioria das interações com a enzima ou em todas elas e, assim, tornar a energia de ligação máxima, explicando a notável especificidade de substrato exibida por muitas enzimas. Além disso, *o complemento completo dessas interações só é formado quando o substrato é convertido no estado de transição.* Por conseguinte, a energia de ligação máxima é liberada quando a enzima facilita a formação do estado de transição. A energia liberada pelas interações entre a enzima e o substrato pode ser considerada como uma redução da energia de ativação. Paradoxalmente, a interação mais estável (energia de ligação máxima) ocorre entre a enzima e o estado de transição, o intermediário menos estável da reação. Todavia, o estado de transição é demasiado instável para existir por muito tempo. Ele

colapsa para o substrato ou para o produto, porém qual dos dois irá se acumular é determinado apenas pela diferença de energia entre o substrato e o produto – isto é pelo ΔG da reação.

8.4 A equação de Michaelis-Menten descreve as propriedades cinéticas de muitas enzimas

O estudo das velocidades das reações químicas é denominado *cinética,* enquanto o estudo das velocidades das reações catalisadas por enzimas é denominado *cinética enzimática.* Uma descrição cinética da atividade enzimática irá nos ajudar a entender como as enzimas funcionam. Começaremos com um breve exame de alguns dos princípios básicos de cinética das reações.

A cinética é o estudo das velocidades das reações

O que queremos dizer quando falamos da "velocidade" de uma reação química? Consideremos uma reação simples:

$$A \rightarrow P$$

A velocidade V é a quantidade de A que desaparece em uma unidade específica de tempo. É igual à velocidade de aparecimento de P ou à quantidade de P que aparece em uma unidade específica de tempo.

$$V = -\Delta A/\Delta T = \Delta P/\Delta T \qquad (8)$$

Se A for amarelo e P incolor, podemos acompanhar a diminuição da concentração de A, medindo a diminuição da intensidade da cor amarela ao longo do tempo. Consideremos por enquanto apenas a mudança na concentração de A. A velocidade da reação está diretamente relacionada com a concentração de A por uma constante de proporcionalidade, k, denominada *constante de velocidade.*

$$V = k[A] \qquad (9)$$

As reações que são diretamente proporcionais à concentração dos reagentes são denominadas *reações de primeira ordem.* As constantes de velocidade de primeira ordem apresentam as unidades de s^{-1}.

Muitas reações bioquímicas importantes incluem dois reagentes. Por exemplo,

$$2A \rightarrow P$$

ou

$$A + B \rightarrow P$$

Elas são denominadas *reações bimoleculares,* e as equações de velocidade correspondentes frequentemente assumem a forma

$$V = k[A]^2 \qquad (10)$$

e

$$V = k[A][B] \quad (11)$$

As constantes de velocidade, denominadas constantes de velocidade de segunda ordem, apresentam as unidades $M^{-1}\ s^{-1}$.

Algumas vezes, reações de segunda ordem podem aparecer como reações de primeira ordem. Por exemplo, na reação 11, se B estiver presente em excesso, e A estiver em baixa concentração, a velocidade da reação será de primeira ordem em relação a A, e não parecerá depender da concentração de B. Essas reações são denominadas *reações de pseudoprimeira ordem, nós* as veremos diversas vezes em nosso estudo da bioquímica.

É interessante observar que, em algumas condições, uma reação pode ser de ordem zero. Nesses casos, a velocidade não depende das concentrações dos reagentes. As reações enzimáticas podem aproximar-se de reações de ordem zero em algumas circunstâncias (p. 234).

A suposição de um estado de equilíbrio dinâmico facilita a descrição da cinética enzimática

A maneira mais simples de investigar a velocidade de reação consiste em acompanhar o aumento do produto da reação em função do tempo. O grau de formação do produto é determinado em função do tempo para uma série de concentrações do substrato (Figura 8.10A). Conforme esperado, em cada caso, a quantidade de produto formado aumenta com o passar do tempo, embora finalmente seja alcançado um momento em que não ocorre *nenhuma mudança efetiva* na concentração de S ou P. A enzima ainda estará convertendo ativamente o substrato em produto, e vice-versa, porém o equilíbrio da reação terá sido alcançado. Entretanto, a cinética enzimática é mais facilmente compreendida se considerarmos apenas a reação direta. Podemos definir a velocidade de catálise V_0 como o número de moles de produto formado por segundo, quando a reação está apenas começando – isto é, quando $t \approx 0$ (ver Figura 8.10A). Na escala temporal de reações catalisadas por enzimas, a quantidade de enzima presente é constante. Quando representamos graficamente V_0 *versus* a concentração de substrato [S], supondo uma quantidade constante de enzima, muitas enzimas irão produzir os resultados mostrados na Figura 8.10B. A velocidade de catálise aumenta de modo linear à medida que aumenta a concentração de substrato e, em seguida, começa a se estabilizar e a se aproximar de um máximo em concentrações mais altas de substrato.

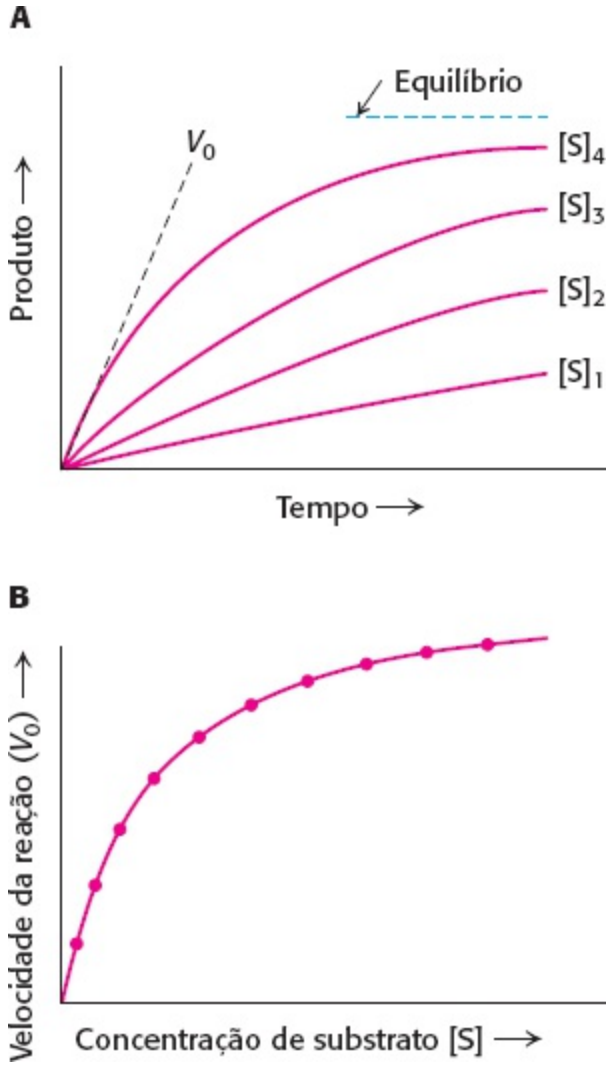


Figura 8.10 Determinação da relação entre a velocidade inicial e a concentração de substrato. A. A quantidade de produto formado, em diferentes concentrações de substrato, é representada graficamente em função do tempo. A velocidade inicial (V_0) para cada concentração de substrato é determinada pela inclinação da curva no início da reação, quando a reação reversa é insignificante. **B.** Os valores para a velocidade inicial determinada na parte A são então representados graficamente contra a concentração de substrato.

Em 1913, Leonor Michaelis e Maud Menten propuseram um modelo simples para explicar essas características cinéticas. A característica crítica de seu tratamento é que um complexo ES específico é um intermediário necessário na catálise. O modelo proposto é

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P$$

Uma enzima E combina-se com o substrato S para formar um complexo ES, com uma constante de velocidade k_1. O complexo ES tem dois destinos possíveis. Ele pode se dissociar em E e S, com uma constante de velocidade k_{-1}, ou pode prosseguir para formar o produto P, com uma constante de velocidade k_2. O complexo ES também pode ser reconstituído a partir de E e P pela reação reversa, com uma constante de velocidade k_{-2}. Todavia, como antes, podemos simplificar essas reações ao considerar a velocidade da reação em um tempo próximo de zero (portanto, V_0), quando a formação do produto é desprezível, e, assim, não há reação reversa (k_{-2} [E][P] ≈ 0).

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad (12)$$

Assim, para o gráfico da Figura 8.11, a V_0 foi determinada para cada concentração de substrato pela medição da velocidade de formação do produto em momentos anteriores ao acúmulo do P (ver Figura 8.10A).

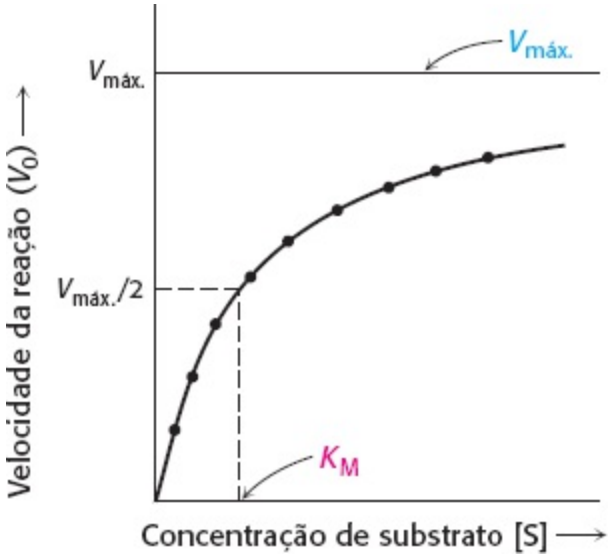


Figura 8.11 Cinética de Michaelis-Menten. Um gráfico da velocidade de reação (V_0) em função da concentração do substrato [S] para uma enzima que obedece à cinética de Michaelis-Menten mostra que a velocidade máxima ($V_{máx.}$) é aproximada de modo assintótico. A constante de Michaelis (K_M) é a concentração de substrato que produz uma velocidade de $V_{máx.}/2$.

Queremos uma expressão que relacione a velocidade de catálise com as concentrações de substrato e de enzima e com as velocidades das etapas individuais. Nosso ponto de partida é que a velocidade de catálise é igual ao produto da concentração do complexo ES por k_2.

$$V_0 = k_2[ES] \qquad (13)$$

Precisamos agora expressar [ES] em termos de quantidades conhecidas. As velocidades de formação e de degradação de ES são dadas por

$$\text{Velocidade de formação de ES} = k_1\,[E][S] \qquad (14)$$

$$\text{Velocidade de degradação de ES} = (k_{-1} + k_2)\,[ES] \qquad (15)$$

Para simplificar o problema, George Briggs e John Haldane sugeriram, em 1924, a *suposição do estado de equilíbrio dinâmico*. Em um estado de equilíbrio dinâmico, as concentrações dos intermediários – neste caso, [ES] – permanecem as mesmas, mesmo se houver mudança nas concentrações dos materiais iniciais e dos produtos. Esse estado de equilíbrio dinâmico é alcançado quando as velocidades de formação e de degradação do complexo ES tornam-se iguais. Estabelecendo a igualdade dos lados direitos das equações 14 e 15, temos

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \qquad (16)$$

Mediante rearranjo da equação 16, obtemos

$$[E][S]\,/[ES] = (k_{-1} + k_2)/k_1 \qquad (17)$$

A equação 17 pode ser simplificada pela definição de uma nova constante, K_M, denominada *constante de Michaelis:*

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \qquad (18)$$

Observe que K_M tem as unidades de concentração e é independente das concentrações da enzima e do substrato. Como iremos explicar adiante, K_M constitui uma importante característica das interações enzima-substrato.

Com a inserção da equação 18 na equação 17 e deduzindo [ES], temos

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \qquad (19)$$

Examinemos agora o numerador da equação 19. Como o substrato está habitualmente presente em uma concentração muito mais alta que a da enzima, a concentração de substrato livre [S] é quase igual à do substrato total. A concentração da enzima livre [E] é igual à concentração de enzima total $[E]_T$, menos a concentração do complexo ES:

$$[E] = [E]_T - [ES] \qquad (20)$$

Aplicando essa expressão para [E] na equação 19, temos

$$[ES] = \frac{([E]_T - [ES])[S]}{K_M} \qquad (21)$$

A resolução da equação 21 para [ES] fornece

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]/K_M}{1 + [S]/K_M} \qquad (22)$$

ou

$$[ES] = [E]_T\frac{[S]}{[S] + K_M} \qquad (23)$$

Substituindo [ES] por esta expressão na equação 13, obtemos

$$V_0 = k_2[E]_T\frac{[S]}{[S] + K_M} \qquad (24)$$

A *velocidade máxima,* $V_{máx.}$ é alcançada quando os sítios catalíticos na enzima estão saturados com substrato – isto é, quando $[ES] = [E]_T$. Por conseguinte,

$$V_{máx.} = k_2[E]T \qquad (25)$$

A aplicação da equação 25 à equação 24 fornece a *equação de Michaelis-Menten*

$$V_0 = V_{máx.}\frac{[S]}{[S] + K_M} \qquad (26)$$

Essa equação explica os dados cinéticos apresentados na Figura 8.11. Em uma concentração muito baixa de substrato, quando [S] é muito menor do que K_M, $V_0 = (V_{máx.}/K_M)[S]$; isto é, a reação é de primeira ordem, com uma velocidade diretamente proporcional à concentração do substrato. Na presença de alta concentração de substrato, quando [S] é muito maior do que K_M, $V_0 = V_{máx.}$; isto é, a velocidade é máxima. A reação é de ordem zero, independente da concentração de substrato.

O significado de K_M é evidente a partir da equação 26. Quando $[S] = K_M$, então $V_0 = V_{máx.}/2$. Por conseguinte, *K_M é igual à concentração de substrato em que a velocidade da reação é metade de seu valor máximo.* K_M constitui uma importante característica de uma reação catalisada por enzima e é significativo pela sua função biológica.

Variações de K_M podem ter consequências fisiológicas

A consequência fisiológica de K_M é ilustrada pela sensibilidade de alguns indivíduos ao etanol. Essas pessoas exibem rubor facial e frequência cardíaca rápida (taquicardia) após a ingestão até mesmo de pequenas quantidades de álcool. No fígado, a álcool desidrogenase converte o etanol em acetaldeído.

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \xrightleftharpoons{\text{Álcool desidrogenase}} CH_3CHO + NADH + H^+$$

Normalmente, o acetaldeído, que constitui a causa dos sintomas quando presente em altas concentrações, é processado a acetato pela aldeído desidrogenase.

$$CH_3CHO + NAD^+ + H_2O \xrightleftharpoons{\text{Álcool desidrogenase}} CH_3COO^- + NADH + 2H^+$$

A maioria das pessoas tem duas formas da aldeído desidrogenase, uma forma mitocondrial com K_M baixa e uma forma citoplasmática com K_M alto. Nos indivíduos suscetíveis, a enzima mitocondrial é menos ativa, devido à substituição de um único aminoácido, e o acetaldeído só é processado pela enzima citoplasmática. Como essa enzima tem um K_M alto, ela só alcança uma velocidade de catálise elevada na presença de concentrações muito altas de acetaldeído. Em consequência, uma menor quantidade de acetaldeído é convertida em acetato; o excesso de acetaldeído escapa no sangue e responde pelos efeitos fisiológicos observados.

Os valores de K_M e $V_{máx.}$ podem ser determinados de vários modos

K_M é igual à concentração de substrato que produz $V_{máx.}/2$; entretanto, a $V_{máx.}$, como a perfeição, só é aproximada, mas nunca alcançada. Como, então, podemos determinar experimentalmente K_M e $V_{máx.}$, e como esses parâmetros ampliam nossa compreensão das reações catalisadas por enzimas? A constante de Michaelis, K_M, e a velocidade máxima, $V_{máx.}$, podem ser prontamente deduzidas das velocidades de catálise medidas em uma variedade de concentrações de substrato, se uma enzima operar de acordo com o esquema simples apresentado na equação 26. A determinação de K_M e da

$V_{máx.}$ é mais comumente obtida com o uso de programas de informática para o ajuste de curvas. Todavia, um método mais antigo, embora raramente utilizado, visto que os pontos dos dados em concentrações altas e baixas têm pesos diferentes e, portanto, são propensos a erros, constitui uma fonte de maior esclarecimento sobre o significado de K_M e $V_{máx.}$.

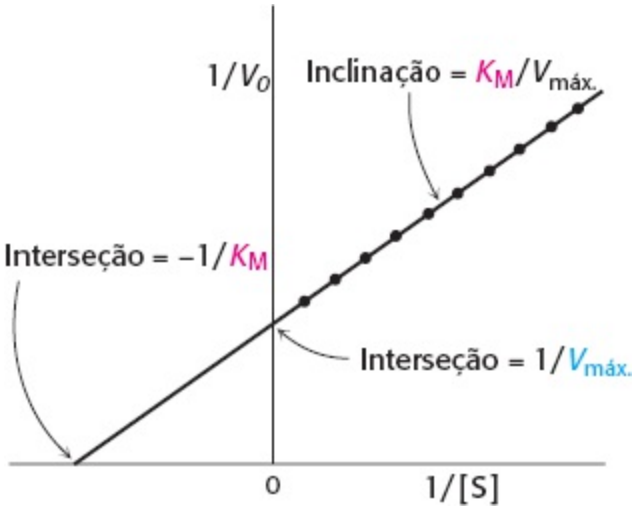


Figura 8.12 Gráfico de dupla-recíproca ou de Lineweaver-Burk. Um gráfico de dupla-recíproca da cinética enzimática é gerado pela representação gráfica de $1/V_0$ como função de 1/[S]. A inclinação é $K_M/V_{máx.}$, a interseção no eixo vertical é $1/V_{máx.}$, e a interseção no eixo horizontal é $-1/K_M$.

Antes da disponibilidade de computadores, a determinação dos valores de K_M e $V_{máx.}$ exigia a manipulação algébrica da equação básica de Michaelis-Menten. Como $V_{máx.}$ é aproximado de modo assintótico (ver Figura 8.11), é impossível obter um valor definitivo a partir de uma curva de Michaelis-Menten. Como K_M é a concentração de substrato em $V_{máx.}/2$, também é impossível determinar um valor preciso de K_M. Entretanto, $V_{máx.}$ pode ser determinada acuradamente se a equação de Michaelis-Menten for transformada em uma equação que forneça um gráfico em linha reta. Tomando-se a recíproca de ambos os lados da equação 26, temos

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{máx.}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{máx.}} \qquad (27)$$

Um gráfico de $1/V_0$ *versus* 1/[S], denominado *gráfico de Lineweaver-Burk* ou de *dupla-recíproca,* fornece uma linha reta, com uma interseção no eixo *y*, de $1/V_{máx.}$ e uma inclinação de $K_M/V_{máx.}$ (Figura 8.12). A interseção no eixo X é $-1/K_M$.

Os valores de K_M e $V_{máx.}$ constituem características importantes das enzimas

Os valores de K_M das enzimas variam amplamente (Tabela 8.4). Para a maioria das enzimas, K_M situa-se entre 10^{-1} e 10^{-7} M. O valor de K_M para determinada enzima depende do substrato particular, bem como das condições ambientais, como pH, temperatura e força iônica. A constante de Michaelis, K_M, tem dois significados. Em primeiro lugar, K_M é a concentração de substrato em que metade dos sítios ativos estão ocupados. Por conseguinte, K_M fornece uma medida da concentração de substrato necessária para que ocorra catálise significativa. No caso de muitas enzimas, as evidências experimentais sugerem que K_M fornece uma aproximação da concentração de substrato *in vivo*.

Tabela 8.4 Valores de K_M de algumas enzimas.

Enzima	Substrato	K_M (μM)
Quimiotripsina	Acetil-L-triptofanamida	5.000
Lisozima	Hexa-*N*-acetilglicosamina	6
β-galactosidase	Lactose	4.000
Treonina desaminase	Treonina	5.000
Anidrase carbônica	CO2	8.000
Penicilinase	Benzilpenicilina	50
Piruvato carboxilase	Piruvato	400
	HCO_3^-	1.000
	ATP	60
Arginina-tRNA sintetase	Arginina	3
	tRNA	0,4
	ATP	300

Em segundo lugar, K_M está relacionado com as constantes de velocidade das etapas individuais no esquema catalítico apresentado na equação 12. Na equação 18, K_M é definido como $(k_{-1} + k_2)/k_1$. Considere um caso em que k_{-1} seja muito maior do que k_2. Nessas circunstâncias, o complexo ES dissocia-se em E e S muito mais rapidamente do que a formação do produto. Nessas condições ($k_{-1} \gg k_2$),

$$K_M \approx \frac{k_{-1}}{k_1} \qquad (28)$$

A equação 28 descreve a constante de dissociação do complexo ES.

$$K_{ES} = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \qquad (29)$$

Em outras palavras, K_M *é igual à constante de dissociação do complexo ES se* k_2 *for muito menor do que* k_{-1}. Quando essa condição é satisfeita, K_M é uma medida da força do complexo ES: Um valor elevado de K_M indica uma ligação fraca, enquanto um K_M baixo indica uma ligação forte. É preciso ressaltar que K_M indica a afinidade do complexo ES somente quando k_{-1} é muito maior do que k_2.

A velocidade máxima, $V_{máx.}$, revela *o número de renovação de uma enzima, que é o número de moléculas de substrato convertidas em produto por uma molécula de enzima na unidade de tempo, quando a enzima está totalmente saturada com o substrato.* É igual à constante de velocidade k_2,

que também é denominada k_{cat}. A velocidade máxima, $V_{máx.}$, revela o número de renovação de uma enzima, se a concentração dos sítios ativos $[E]_T$ for conhecida, visto que

$$V_{máx.} = k_2[E]_T \qquad (30)$$

e, portanto,

$$k_2 = V_{máx.}/[E]_T \qquad (31)$$

Por exemplo, uma solução 10^{-6} M de anidrase carbônica catalisa a formação de 0,6 M H_2CO_3 por segundo, quando a enzima está totalmente saturada com substrato. Por conseguinte, k_2 é 6×10^5 s^{-1}. Esse número de renovação é um dos maiores conhecidos. Cada reação catalisada ocorre em um tempo igual, em média, a $1/k_2$, que é de 1,7 µs para a anidrase carbônica. Os números de renovação da maioria das enzimas com seus substratos fisiológicos variam de 1 a 10^4 por segundo (Tabela 8.5).

K_M e $V_{máx.}$ também possibilitam a determinação de f_{ES}, a fração de sítios ativos preenchidos. Essa relação entre f_{ES} e K_M e $V_{máx.}$ é fornecida pela seguinte equação:

$$f_{ES} = \frac{V}{V_{máx.}} = \frac{[S]}{[S] + K_M} \qquad (32)$$

Tabela 8.5 Números de renovação de algumas enzimas.

Enzima	Número de renovação (por segundo)
Anidrase carbônica	600.000
3-cetosteroide isomerase	280.000
Acetilcolinesterase	25.000
Penicilinase	2.000
Lactato desidrogenase	1.000
Quimiotripsina	100
DNA polimerase I	15
Triptofano sintetase	2
Lisozima	0,5

k_{cat}/K_M é uma medida da eficiência catalítica

Quando a concentração de substrato é muito maior do que K_M, a velocidade de catálise é igual à $V_{máx.}$, que é uma função de k_{cat}, o número de renovação, conforme já descrito. Todavia, a maioria das enzimas normalmente não está saturada com substrato. Em condições fisiológicas, a razão $[S]/K_M$

tipicamente está situada entre 0,01 e 1,0. Quando [S] ≪ K_M, a velocidade enzimática é muito menor do que k_{cat}, visto que a maioria dos sítios ativos não estão ocupados. Existe algum número que caracterize a cinética de uma enzima nessas condições celulares mais típicas? Na realidade, esse número existe, como mostra a combinação das equações 13 e 19, dando

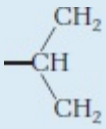
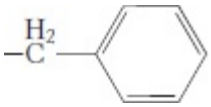
$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_M}[E][S] \qquad (33)$$

Quando [S] ≪ K_M, a concentração de enzima livre [E] é quase igual à concentração total da enzima $[E]_T$; portanto,

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_M}[S][E]_T \qquad (34)$$

Assim, quando [S] ≪ K_M, a velocidade enzimática depende dos valores de k_{cat}/K_M, [S] e $[E]_T$. Nessas condições, k_{cat}/K_M é a constante de velocidade para a interação entre S e E. A constante de velocidade k_{cat}/K_M é uma medida da eficiência catalítica, visto que leva em consideração tanto a velocidade de catálise com determinado substrato (k_{cat}) quanto a força da interação entre enzima e substrato (K_M). Por exemplo, usando os valores de k_{cat}/K_M, podemos comparar a preferência de uma enzima para diferentes substratos. A Tabela 8.6 mostra os valores de k_{cat}/K_M para vários substratos diferentes da quimiotripsina. A quimiotripsina demonstra claramente ter uma preferência para efetuar uma clivagem perto de cadeias laterais hidrofóbicas volumosas.

Tabela 8.6 Preferências da quimiotripsina por substratos.

Aminoácido em éster	Cadeia lateral de aminoácido	k_{cat}/K_M ($s^{-1}\,M^{-1}$)
Glicina	—H	$1{,}3 \times 10^{-1}$
Valina		2,0
Norvalina	$—CH_2CH_2CH_3$	$3{,}6 \times 10^{2}$
Norleucina	$—CH_2CH_2CH_2CH_3$	$3{,}0 \times 10^{3}$
Fenilalanina		$1{,}0 \times 10^{5}$

Fonte: A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (W. H. Freeman and Company, 1999), Tabela 7.3.

O quão eficiente pode ser uma enzima? Podemos abordar essa questão ao determinar se existe algum limite físico para o valor de k_{cat}/K_M. Observe que *a razão* k_{cat}/K_M *depende de* k_1, k_{-1} e k_{cat}, como podemos mostrar pela substituição de K_M.

$$k_{cat}/K_M = \frac{k_{cat}k_1}{k_{-1} + k_{cat}} = \left(\frac{k_{cat}}{k_{-1} + k_{cat}}\right)k_1 < k_1 \qquad (35)$$

Suponhamos que a velocidade de formação do produto (k_{cat}) seja muito mais rápida que a velocidade de dissociação do complexo ES (k_{-1}). O valor de k_{cat}/K_M aproxima-se então de k_1. Por conseguinte, o limite final para o valor de k_{cat}/K_M é estabelecido por k_1, a velocidade de formação do complexo ES. *Essa velocidade não pode ser maior que o encontro controlado pela difusão de uma enzima com o seu substrato.* A difusão limita o valor de k_1 e, portanto, não pode ser maior do que entre 10^8 e 10^9 s^{-1} M^{-1}. Por conseguinte, o limite superior para k_{cat}/K_M situa-se entre 10^8 e 10^9 s^{-1} M^{-1}.

Tabela 8.7 Enzimas para as quais k_{cat}/K_M está próximo da taxa de encontro controlada pela difusão.

Enzima	*k*cat/*K*M (s−1 M−1)
Acetilcolinesterase	$1,6 \times 10^8$
Anidrase carbônica	$8,3 \times 10^7$
Catalase	4×10^7
Crotonase	$2,8 \times 10^8$
Fumarase	$1,6 \times 10^8$
Triose fosfato isomerase	$2,4 \times 10^8$
Betalactamase	1×10^8
Superóxido dismutase	7×10^9

Fonte: A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (W. H. Freeman and Company, 1999), Tabela 4.5.

As razões k_{cat}/K_M das enzimas superóxido dismutase, acetilcolina esterase e triose fosfato isomerase situam-se entre 10^8 e 10^9 s^{-1} M^{-1}. Enzimas que apresentam razões k_{cat}/K_M nos limites superiores alcançaram a *perfeição cinética. A sua velocidade de catálise só é restrita pela velocidade com a qual elas encontram o substrato na solução* (Tabela 8.7). Qualquer ganho adicional na velocidade de catálise só pode ocorrer pela diminuição do tempo de difusão do substrato para o ambiente imediato da enzima. Convém lembrar que o sítio ativo constitui apenas uma pequena parte da estrutura total da enzima. Contudo, para as enzimas com perfeição catalítica, cada encontro entre enzima e substrato é produtivo. Nesses casos, pode haver forças eletrostáticas de atração na enzima que atraem o substrato para o sítio ativo. Essas forças são algumas vezes designadas poeticamente como *efeitos Circe*.

A difusão de um substrato por uma solução também pode ser parcialmente superada pelo confinamento de substratos e produtos no volume limitado de um complexo multienzimático. Algumas séries de enzimas estão organizadas em complexos, de tal modo que o produto de uma enzima é rapidamente encontrado pela enzima seguinte. Com efeito, os produtos são canalizados de uma enzima para a próxima, de modo semelhante a uma linha de montagem.

Efeito Circe

Refere-se à utilização de forças de atração para atrair um substrato até um local onde sofra uma transformação de estrutura, conforme definido por William P. Jencks, um enzimologista, que criou o termo.

Uma deusa da mitologia grega, Circe, atraiu os homens de Ulisses para a sua casa e, então, os transformou em porcos.

A maioria das reações bioquímicas inclui múltiplos substratos

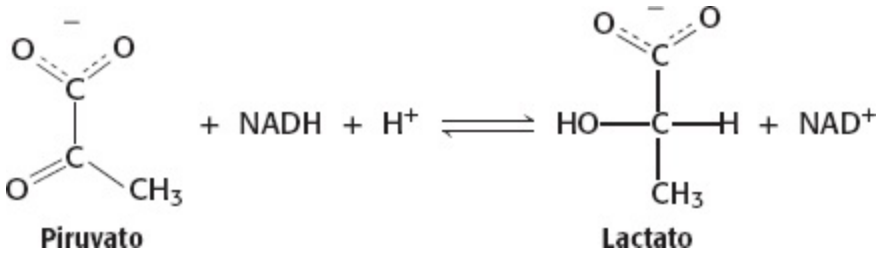
A maioria das reações nos sistemas biológicos começa com dois substratos e resulta em dois produtos. Podem ser representadas pela reação com dois substratos:

$$A + B \rightleftharpoons P + Q$$

Muitas dessas reações transferem um grupo funcional, como fosforila ou grupo amônio, de um substrato para outro. As reações de oxidorredução transferem elétrons entre substratos. As reações com múltiplos substratos podem ser divididas em duas classes: reações *sequenciais* e reações de *duplo deslocamento.*

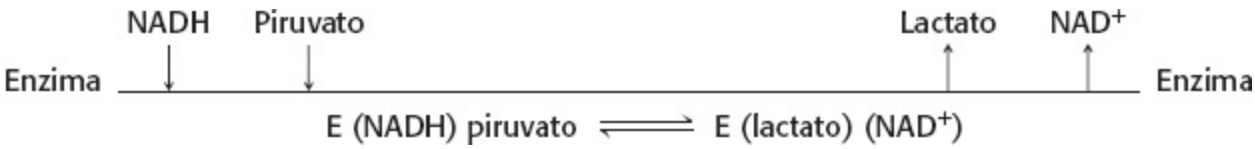
Reações sequenciais. Nas *reações sequenciais,* todos os substratos precisam se ligar à enzima antes que ocorra liberação de qualquer produto. Em consequência, em uma reação com dois substratos, forma-se um *complexo ternário* da enzima com ambos os substratos. Os mecanismos sequenciais são de dois tipos: ordenados, em que os substratos ligam-se à enzima em uma sequência definida, e aleatórios.

Muitas enzimas que têm NAD^+ ou NADH como substrato exibem o mecanismo sequencial ordenado. Consideremos a lactato desidrogenase, uma enzima importante no metabolismo da glicose (Seção 16.1). Essa enzima reduz o piruvato a lactato, enquanto oxida NADH a NAD^+.



Piruvato Lactato

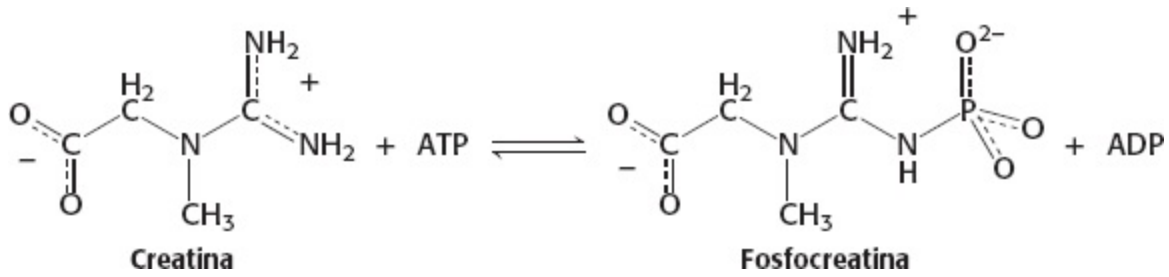
No mecanismo sequencial ordenado, a coenzima sempre se liga em primeiro lugar, enquanto o lactato é sempre o primeiro a ser liberado. Essa sequência pode ser representada pelo uso de uma notação desenvolvida por W. Wallace Cleland:



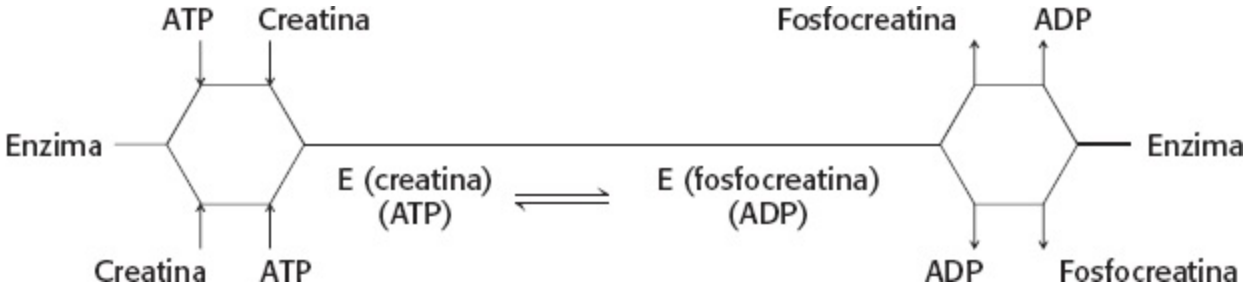
A enzima existe na forma de um complexo ternário, constituído, inicialmente, pela enzima e pelos substratos e, depois da catálise, pela enzima com os produtos.

No mecanismo sequencial aleatório, a ordem de adição dos substratos e a liberação dos produtos é aleatória. Um exemplo de reação sequencial aleatória é a formação de fosfocreatinina e ADP a

partir do ATP e creatina, em uma reação catalisada pela creatinoquinase.

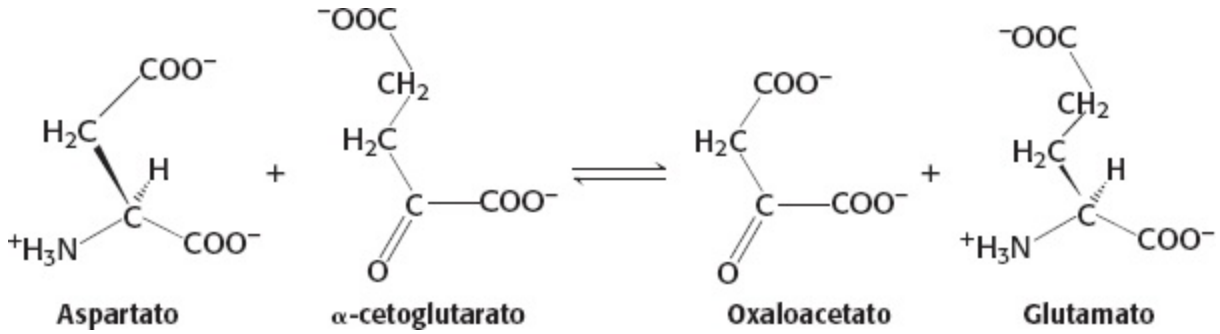


Tanto a creatina quanto o ATP podem ligar-se primeiro, e tanto a fosfocreatina quanto o ADP podem ser liberados primeiro. A fosfocreatina representa uma importante fonte de energia no músculo. As reações sequenciais aleatórias também podem ser representadas de acordo com a notação de Cleland.

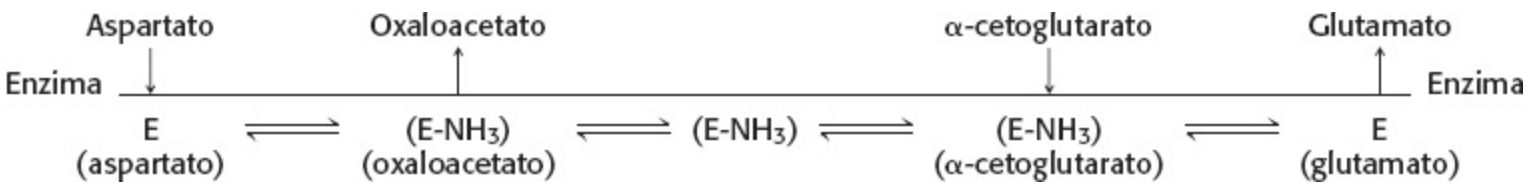


Embora a ordem de certos eventos seja aleatória, a reação ainda passa pelos complexos ternários, incluindo inicialmente os substratos e, em seguida, os produtos.

Reações de duplo deslocamento (pingue-pongue). *Nas reações de duplo deslocamento,* ou *em pingue-pongue,* um ou mais produtos são liberados antes da ligação de todos os substratos à enzima. A característica que define as reações de duplo deslocamento é a existência de um *intermediário enzimático substituído,* em que a enzima está temporariamente modificada. As reações que transportam grupos amino entre aminoácidos e α-cetoácidos são exemplos clássicos de mecanismos de duplo deslocamento. A enzima aspartato aminotransferase catalisa a transferência de um grupo amino do aspartato para o α-cetoglutarato.



A sequência de eventos pode ser representada de acordo com a seguinte notação de Cleland:



Após a ligação do aspartato à enzima, esta aceita o grupo amino do aspartato para formar o intermediário enzimático substituído. O primeiro produto, o oxaloacetato, é liberado em seguida. O segundo substrato, o α-cetoglutarato, liga-se à enzima, aceita o grupo amino da enzima modificada e, em seguida, é liberado como produto final, o glutamato. Na notação de Cleland, os substratos parecem saltar para dentro e para fora da enzima, de modo muito semelhante a uma bola de pingue-pongue em uma mesa.

As enzimas alostéricas não obedecem à cinética de Michaelis-Menten

A equação de Michaelis-Menten ajudou muito o desenvolvimento da enzimologia. Suas vantagens são sua simplicidade e ampla aplicabilidade; entretanto, essa equação não pode explicar as propriedades cinéticas de muitas enzimas. Um importante grupo de enzimas que não obedecem à cinética de Michaelis-Menten é constituído pelas *enzimas alostéricas.* Essas enzimas são constituídas de múltiplas subunidades e múltiplos sítios ativos.

Com frequência, as enzimas alostéricas exibem gráficos sigmoides (Figura 8.13) da velocidade da reação V_0 *versus* a concentração de substrato [S], em lugar dos gráficos hiperbólicos previstos pela equação de Michaelis-Menten (equação 26). Nas enzimas alostéricas, a ligação do substrato a um sítio ativo pode alterar as propriedades de outros sítios ativos na mesma molécula de enzima. Um possível resultado dessa interação entre subunidades é que a ligação do substrato torna-se *cooperativa, isto é*, a ligação do substrato a um sítio ativo facilita a ligação de substrato aos outros sítios ativos. Conforme observado no caso da hemoglobina (Capítulo 7), essa cooperatividade resulta em um gráfico sigmoide de V_0 *versus* [S]. Além disso, a atividade de uma enzima alostérica pode ser alterada por moléculas reguladoras que se ligam reversivelmente a sítios específicos diferentes dos sítios catalíticos. Por conseguinte, as propriedades catalíticas das enzimas alostéricas podem ser ajustadas para atender às necessidades imediatas de uma célula (Capítulo 10). Por esse motivo, as enzimas alostéricas constituem reguladores-chave das vias metabólicas.

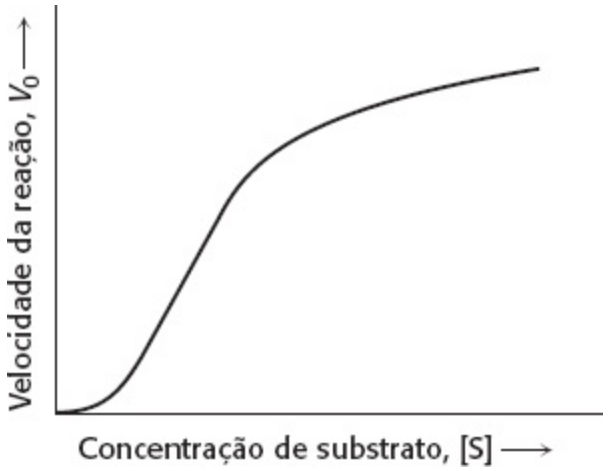


Figura 8.13 Cinética de uma enzima alostérica. As enzimas alostéricas exibem uma dependência sigmoide da velocidade da reação em relação à concentração de substrato.

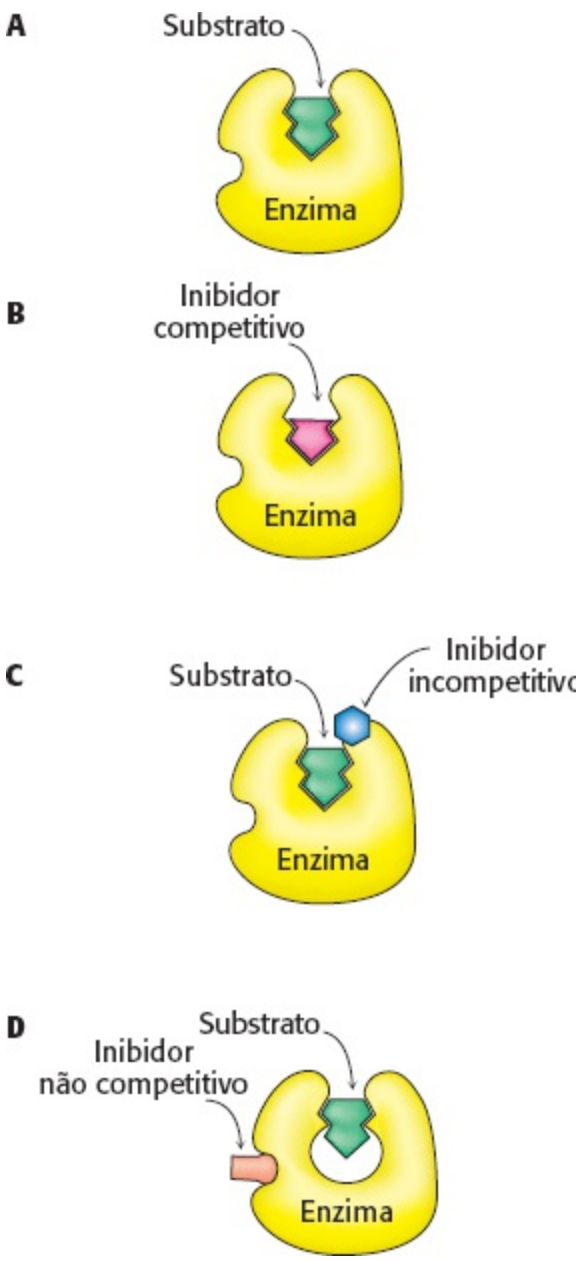


Figura 8.14 Distinção entre inibidores reversíveis. A. Complexo enzima-substrato; **B.** um inibidor competitivo liga-se ao sítio ativo e, assim, impede a ligação do substrato; **C.** um inibidor incompetitivo liga-se apenas ao complexo enzima-substrato; **D.** um inibidor não competitivo não impede a ligação do substrato.

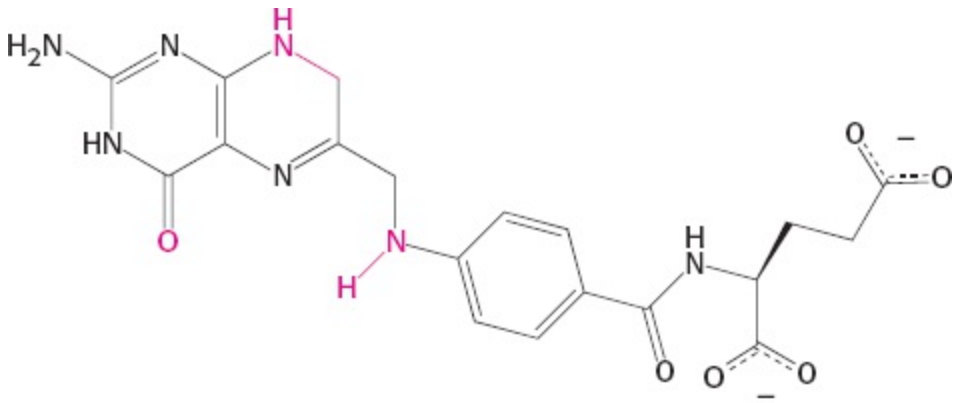
8.5 As enzimas podem ser inibidas por moléculas específicas

A atividade de muitas enzimas pode ser inibida pela ligação de pequenas moléculas e íons específicos. Esse modo de inibir a atividade enzimática serve como um importante mecanismo de controle nos sistemas biológicos, exemplificado pela regulação das enzimas alostéricas. Além disso, muitos fármacos e agentes tóxicos atuam inibindo enzimas (Capítulo 36). A inibição pode constituir uma fonte de esclarecimento com relação ao mecanismo de ação enzimática: com frequência, inibidores específicos podem ser utilizados para identificar resíduos críticos para a catálise. Os análogos de estado de transição são inibidores particularmente potentes.

A inibição das enzimas pode ser irreversível ou reversível. Um *inibidor irreversível* dissocia-se muito lentamente de sua enzima-alvo, visto que está ligado firmemente à enzima, seja de modo covalente ou não covalente. Alguns inibidores irreversíveis são fármacos importantes. A penicilina atua ao modificar covalentemente a enzima transpeptidase, impedindo, desse modo, a síntese das

paredes bacterianas e matando consequentemente as bactérias (p. 246). O ácido acetilsalicílico atua ao modificar de modo covalente a enzima ciclo-oxigenase, reduzindo a síntese de moléculas sinalizadoras na inflamação.

Diferentemente da inibição irreversível, *a inibição reversível* caracteriza-se por uma rápida dissociação do complexo enzima-inibidor. No tipo de inibição reversível denominado *inibição competitiva,* a enzima pode ligar-se ao substrato (formando um complexo ES) ou ao inibidor (EI), mas não a ambos (ESI, complexo enzima-substrato-inibidor). Com frequência, o inibidor competitivo assemelha-se ao substrato e liga-se ao sítio ativo da enzima (Figura 8.14). Por conseguinte, o substrato é impedido de se ligar ao mesmo sítio ativo. *Um inibidor competitivo diminui a velocidade de catálise ao reduzir a proporção de moléculas de enzima ligadas a um substrato.* Em qualquer concentração determinada de inibidor, a inibição competitiva pode ser removida pelo aumento da concentração do substrato. Nessas condições, o substrato compete com sucesso com o inibidor pelo sítio ativo. O metotrexato é um inibidor competitivo particularmente potente da enzima di-hidrofolato redutase, que desempenha um papel na biossíntese de purinas e pirimidinas. O metotrexato é um análogo estrutural do di-hidrofolato, um substrato para a di-hidrofolato redutase (Figura 8.15). O que faz dele um potente inibidor competitivo é a sua capacidade de se ligar à enzima 1.000 vezes mais firmemente do que o substrato natural, inibindo a síntese de bases nucleotídicas. Esse fármaco é utilizado no tratamento do câncer.



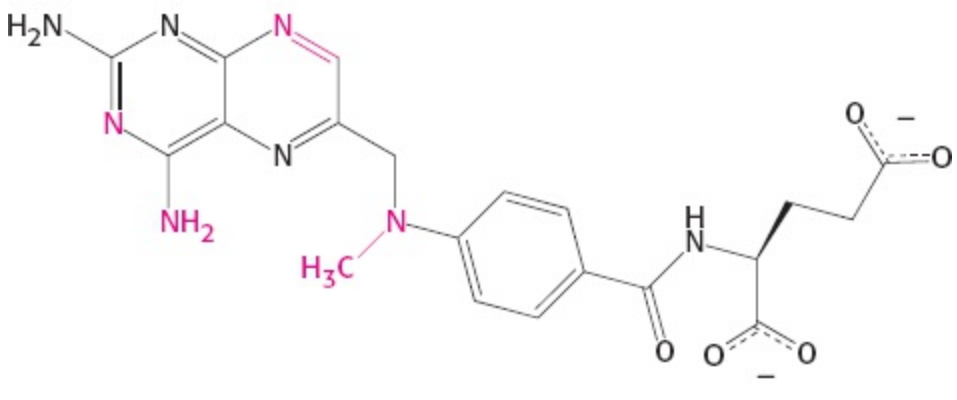


Figura 8.15 Inibidores enzimáticos. O substrato di-hidrofolato e seu análogo estrutural, o metotrexato. As regiões com diferenças estruturais são mostradas em vermelho.

A *inibição incompetitiva* distingue-se pelo fato de que o inibidor só se liga ao complexo enzima-substrato. O sítio de ligação do inibidor incompetitivo só é criado pela interação da enzima com o substrato (Figura 8.14C). A inibição incompetitiva não pode ser superada pela adição de mais

substrato.

Na *inibição não competitiva,* o inibidor e o substrato podem ligar-se simultaneamente a uma molécula de enzima em diferentes sítios de ligação (Figura 8.14D). Diferentemente da inibição incompetitiva, um inibidor não competitivo pode ligar-se à enzima livre ou ao complexo enzima-substrato. Um inibidor não competitivo atua diminuindo a concentração de enzima funcional, em lugar de reduzir a proporção de moléculas de enzima que estão ligadas ao substrato. O efeito final consiste em uma diminuição do número de renovação. A inibição não competitiva, à semelhança da inibição incompetitiva, não pode ser anulada pelo aumento da concentração de substrato. Um padrão mais complexo, denominado *inibição mista,* é produzido quando um único inibidor dificulta a ligação do substrato e também diminui o número de renovação da enzima.

Os inibidores reversíveis podem ser distinguidos pela cinética

Como podemos determinar se um inibidor reversível atua por inibição competitiva, incompetitiva ou não competitiva? Consideremos apenas as enzimas que exibem cinética de Michaelis-Menten. As medições das velocidades de catálise em diferentes concentrações de substrato e inibidor servem para distinguir os três tipos de inibição. Na *inibição competitiva,* o inibidor compete com o substrato pelo sítio ativo. A constante de dissociação para o inibidor é dada por

$$K_i = [E][I]/[EI]$$

Quanto menor o valor de K_i, mais potente a inibição. *A característica fundamental da inibição competitiva é que ela pode ser anulada por uma concentração suficientemente alta de substrato* (Figura 8.16). O efeito de um inibidor competitivo consiste em aumentar o valor aparente de K_M, o que significa a necessidade de mais substrato para obter a mesma velocidade de reação. Esse novo valor de K_M, denominado K_M^{ap}, é numericamente igual a

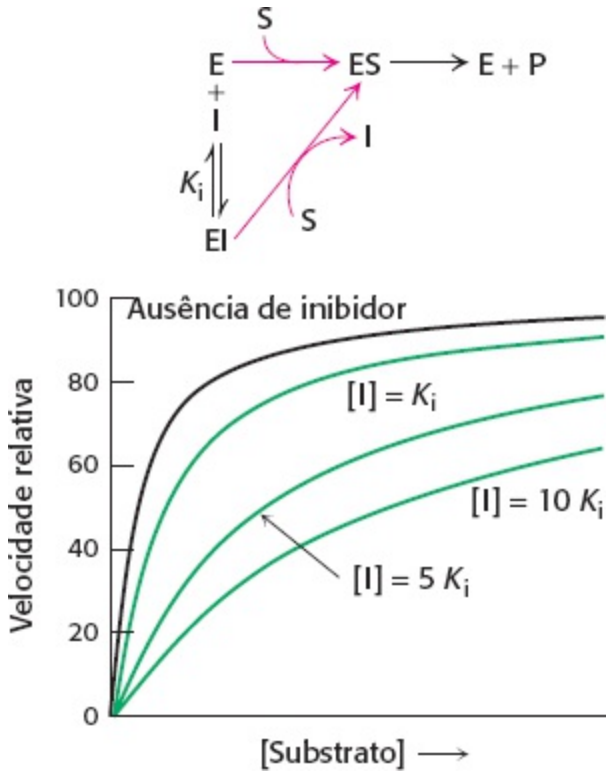


Figura 8.16 Cinética de um inibidor competitivo. À medida que a concentração de um inibidor competitivo aumenta, são

necessárias maiores concentrações de substrato para alcançar uma determinada velocidade de reação. A via da reação sugere como concentrações suficientemente altas de substrato podem aliviar por completo a inibição competitiva.

$$K_M^{ap} = K_M(1 + [I]/K_i)$$

em que [I] é a concentração do inibidor, e K_i é a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor. Na presença de um inibidor competitivo, uma enzima terá a mesma $V_{máx.}$ do que na sua ausência. Com uma concentração suficientemente alta, praticamente todos os sítios ativos estão ocupados pelo substrato, e a enzima está totalmente operante.

Os inibidores competitivos são comumente usados como medicamentos. Fármacos como o ibuprofeno são inibidores competitivos de enzimas que participam nas vias de sinalização da resposta inflamatória. As estatinas são fármacos que reduzem os níveis elevados de colesterol ao inibir competitivamente uma enzima essencial na biossíntese do colesterol.

Na *inibição incompetitiva,* o inibidor liga-se apenas ao complexo ES. Esse complexo enzima-substrato-inibidor, ESI, não prossegue para formar qualquer produto. Como algum complexo ESI improdutivo estará sempre presente, a $V_{máx.}$ será menor na presença do inibidor do que na sua ausência (Figura 8.17). O inibidor incompetitivo diminui o valor aparente de K_M, visto que ele se liga ao complexo ES para formar ESI, causando depleção de ES. Para manter o equilíbrio entre E e ES, uma maior quantidade de S liga-se à E. Por conseguinte, é necessária uma menor concentração de S para formar metade da concentração máxima de ES, e o valor aparente de K_M é reduzido. O herbicida glifosato, também conhecido como Roundup, é um inibidor incompetitivo de uma enzima na via de biossíntese dos aminoácidos aromáticos.

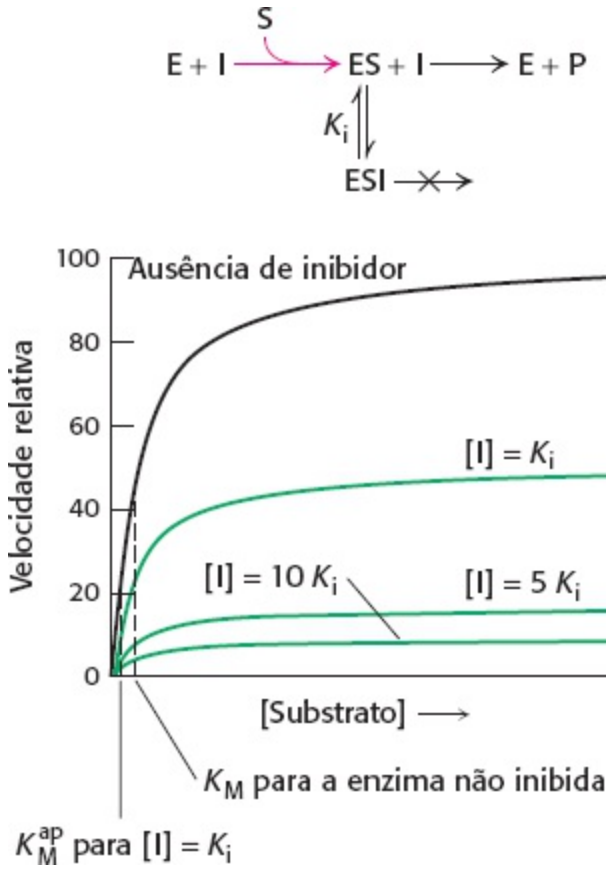


Figura 8.17 Cinética de um inibidor incompetitivo. A via da reação mostra que o inibidor só se liga ao complexo enzima-substrato. Em consequência, a $V_{máx.}$ não pode ser alcançada, mesmo com concentrações altas do substrato. O valor aparente de K_M é reduzido, tornando-se menor à medida que mais inibidor é adicionado.

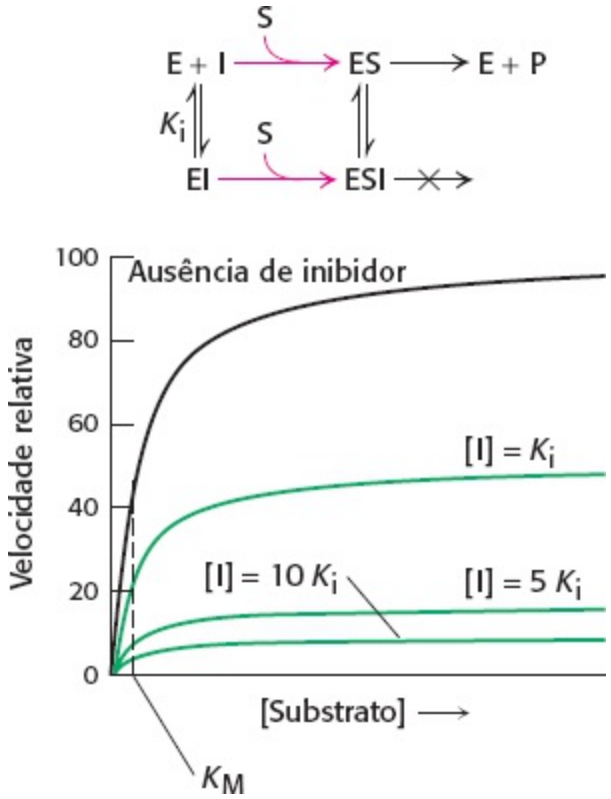


Figura 8.18 Cinética de um inibidor não competitivo. A via da reação mostra que o inibidor liga-se tanto à enzima livre quanto ao complexo enzima-substrato. Em consequência, como no caso da inibição incompetitiva, a $V_{máx.}$ não pode ser alcançada. O K_M permanece inalterado, de modo que a velocidade da reação aumenta mais lentamente em baixas concentrações de substrato do que no caso da inibição incompetitiva.

Na *inibição não competitiva* (Figura 8.18), o substrato ainda pode se ligar ao complexo enzima-inibidor. Todavia, o complexo enzima-inibidor-substrato *não* prossegue para formar qualquer produto. O valor de $V_{máx.}$ é diminuído para um novo valor denominado $V^{ap}_{máx}$, enquanto o valor de K_M permanece inalterado. A velocidade máxima na presença de um inibidor não competitivo puro, $V^{ap}_{máx}$, é dada por

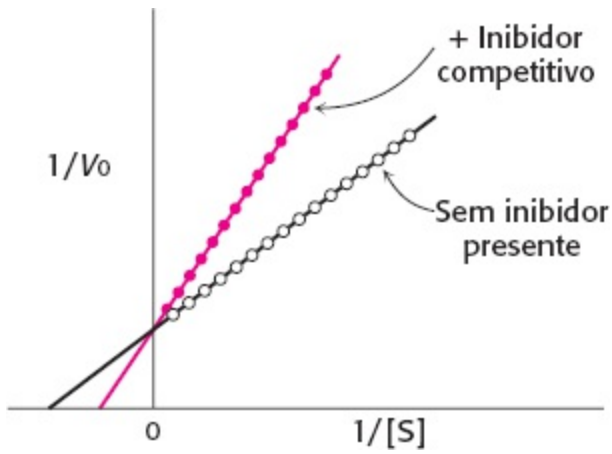


Figura 8.19 Inibição competitiva ilustrada em um gráfico de dupla-recíproca. Um gráfico de dupla-recíproca da cinética enzimática na presença e na ausência de um inibidor competitivo ilustra que o inibidor não tem nenhum efeito sobre a $V_{máx.}$, porém aumenta o K_M.

$$V^{ap}_{máx.} = \frac{V_{máx.}}{1 + [I]/K_i} \qquad (36)$$

Por que a $V_{máx.}$ diminui, enquanto K_M permanece inalterado? Em essência, o inibidor simplesmente

diminui a concentração de enzima funcional. A solução resultante comporta-se como uma solução mais diluída da enzima. *A inibição não competitiva não pode ser anulada pelo aumento da concentração de substrato.* A desoxiciclina, um antibiótico, atua em baixas concentrações como inibidor não competitivo de uma enzima proteolítica (colagenase). A desoxiciclina é usada no tratamento da doença periodontal. Alguns dos efeitos tóxicos do envenenamento pelo chumbo podem ser devidos à capacidade do chumbo de atuar como inibidor não competitivo de diversas enzimas. O chumbo reage com grupos sulfidrila importantes dessas enzimas.

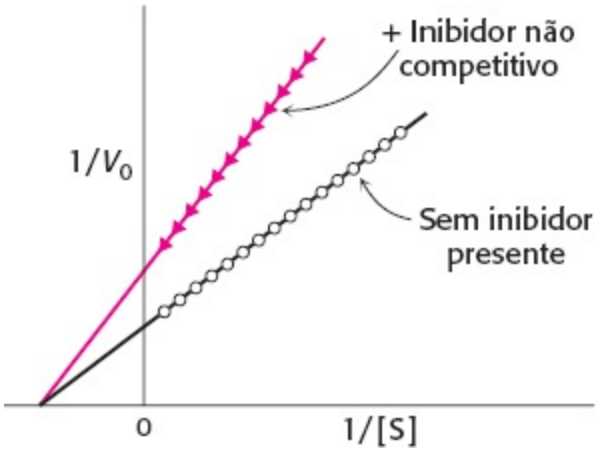


Figura 8.20 Inibição incompetitiva ilustrada por um gráfico de dupla-recíproca. Um inibidor incompetitivo não afeta a inclinação do gráfico de dupla recíproca. A $V_{máx.}$ e o K_M são reduzidos em quantidades equivalentes.

Os gráficos de dupla-recíproca são particularmente úteis para distinguir os inibidores competitivos, incompetitivos e não competitivos. Na inibição competitiva, a interseção no eixo *y* do gráfico de $1/V_0$ *versus* 1/[S] é a mesma na presença e na ausência do inibidor, embora ocorra aumento da inclinação (Figura 8.19). A interseção não se modifica, visto que um inibidor competitivo não altera a $V_{máx.}$. O aumento na inclinação do gráfico $1/V_0$ versus $1/S_0$ indica a força de ligação de um inibidor competitivo. Na presença de um inibidor competitivo, a equação 27 é substituída por

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{máx.}} + \frac{K_M}{V_{máx.}}\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)\left(\frac{1}{[S]}\right) \qquad (37)$$

Em outras palavras, a inclinação do gráfico é aumentada pelo fator $(1 + [I]/K_i)$ na presença de um inibidor competitivo. Consideremos uma enzima com K_M de 10^{-4}. Na ausência de inibidor, $V_0 = V_{máx.}/2$ quando $[S] = 10^{-4}$ M. Na presença do inibidor competitivo 2×10^{-3} M, que está ligado à enzima com um K_i de 10^{-3} M, o K_M aparente (K_M^{ap}) será igual a K_M $(1 + [I]/K_i)$ ou 3×10^{-4} M. A aplicação desses valores na equação 37 da $V_0 = V_{máx.}/4$, quando $[S] = 10^{-4}$ M. A presença do inibidor competitivo reduz, portanto, a velocidade da reação à metade nessa concentração de substrato.

Na inibição incompetitiva (Figura 8.20), o inibidor só se combina com o complexo enzima-substrato. A equação que descreve o gráfico de dupla recíproca para um inibidor incompetitivo é

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{máx.}}\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx.}}\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \qquad (38)$$

A inclinação da linha, $K_M/V_{máx.}$, é a mesma que a da enzima não inibida, porém a interseção no eixo do *y* será aumentada de $1 + [I]/K_i$. Em consequência, as linhas nos gráficos de dupla-recíproca serão

paralelas.

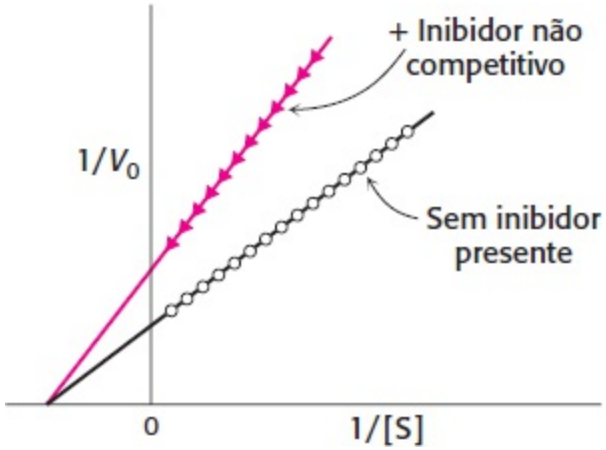


Figura 8.21 Inibição não competitiva ilustrada em um gráfico de dupla-recíproca. Um gráfico de dupla-recíproca da cinética enzimática na presença e na ausência de um inibidor não competitivo mostra que o K_M não é alterado, enquanto a $V_{máx.}$ diminui.

Na inibição não competitiva (Figura 8.21), o inibidor pode combinar-se tanto com a enzima quanto com o complexo enzima-substrato. Na inibição não competitiva pura, os valores das constantes de dissociação do inibidor e da enzima e do inibidor e do complexo enzima-substrato são iguais. O valor de $V_{máx.}$ é diminuído para o novo valor de $V^{ap}_{máx}$, e, portanto, a interseção no eixo vertical é aumentada. A nova inclinação, que é igual a $K_M/V^{ap}_{máx}$, é maior pelo mesmo fator. Diferentemente da $V_{máx.}$, a K_M não é afetada pela inibição não competitiva pura.

Inibidores irreversíveis podem ser usados para mapear o sítio ativo

No Capítulo 9, examinaremos os detalhes químicos do funcionamento das enzimas. O primeiro passo na elucidação do mecanismo químico de uma enzima é determinar que grupos funcionais são necessários para a atividade enzimática. Como podemos estabelecer quais são esses grupos funcionais? A cristalografia de raios X da enzima ligada a seu substrato ou ao análogo do substrato fornece uma abordagem. Os inibidores irreversíveis que se ligam de modo covalente à enzima fornecem um meio alternativo e frequentemente complementar: os inibidores modificam os grupos funcionais, que podem ser então identificados. Os inibidores irreversíveis podem ser divididos em três categorias: reagentes específicos de grupos, análogos de substratos reativos (também denominados marcadores de afinidade) e inibidores suicidas.

Os *reagentes específicos de grupos* reagem com cadeias laterais específicas de aminoácidos. Um exemplo de um reagente específico de grupo é o di-isopropilfosfofluoridato (DIPF). O DIPF modifica apenas um dos 28 resíduos de serina na quimiotripsina, uma enzima proteolítica, demonstrando que esse resíduo de serina é particularmente reativo. Como veremos no Capítulo 9, esse resíduo de serina está, de fato, localizado no sítio ativo. O DIPF também revelou um resíduo de serina reativo na acetilcolinesterase, uma enzima importante na transmissão de impulsos nervoso (Figura 8.22). Por conseguinte, o DIPF e compostos semelhantes que se ligam à acetilcolinesterase e a inativam são potentes gases neurotóxicos. Muitos reagentes específicos de grupos não exibem a notável especificidade demonstrada pelo DIPF. Em consequência, são necessários meios mais específicos para modificar o sítio ativo.

Os *marcadores de afinidade* ou *análogos de substratos reativos* são moléculas estruturalmente semelhantes ao substrato da enzima, que se ligam de modo covalente a resíduos do sítio ativo. Por conseguinte, são mais específicos para o sítio ativo da enzima do que os reagentes específicos de grupos. A tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK) é um análogo do substrato da quimiotripsina (Figura 8.23). A TPCK liga-se ao sítio ativo e, em seguida, reage de modo irreversível com um resíduo de histidina nesse sítio, inibindo a enzima. O composto 3-bromoacetol fosfato é um marcador de afinidade para a enzima triose fosfato isomerase (TPI). Ele imita o substrato normal, a di-hidroxiacetona fosfato, ligando-se ao sítio ativo; em seguida, modifica de modo covalente a enzima, que é irreversivelmente inibida (Figura 8.24).

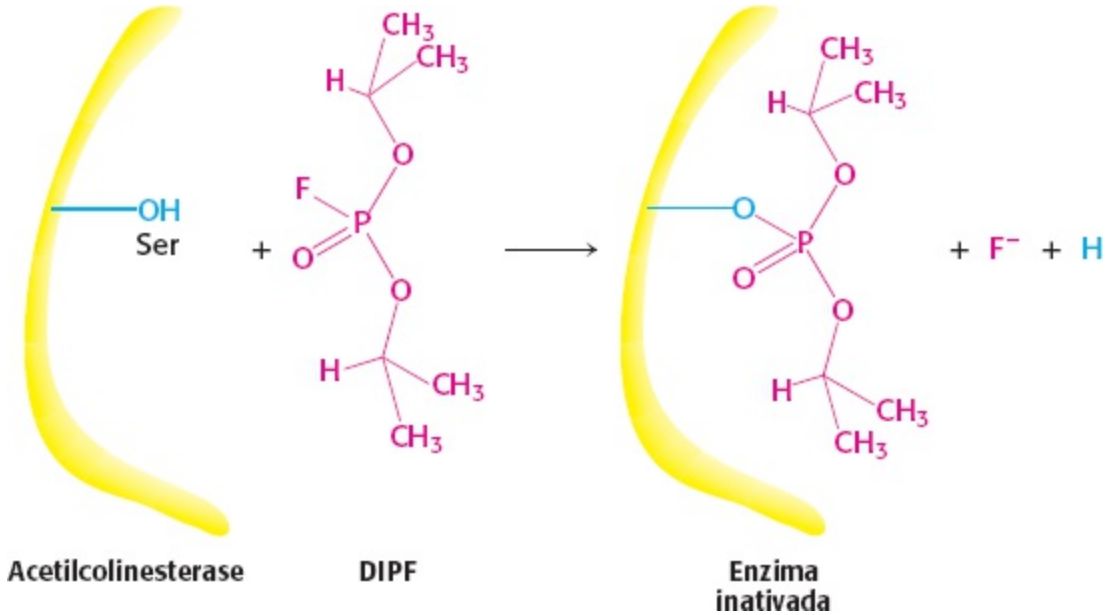


Figura 8.22 Inibição da enzima pelo di-isopropilfosfofluoridato (DIPF), um reagente específico de grupo. O DIPF pode inibir uma enzima ao modificar de modo covalente um resíduo de serina crucial.

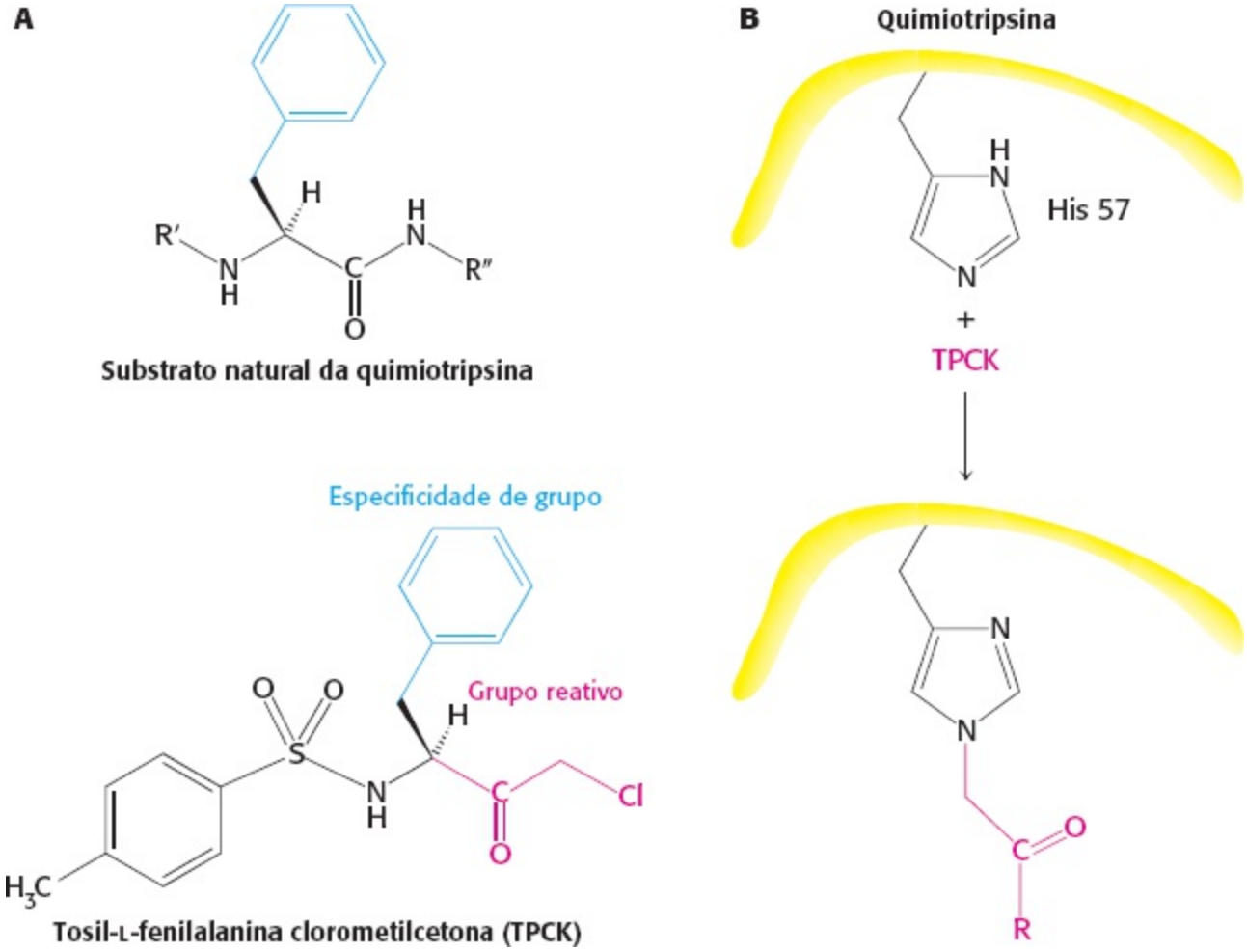


Figura 8.23 Marcação por afinidade. A. A tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK) é um análogo reativo do substrato normal da enzima quimiotripsina. **B.** A TPCK liga-se ao sítio ativo da quimiotripsina e modifica um resíduo de histidina essencial.

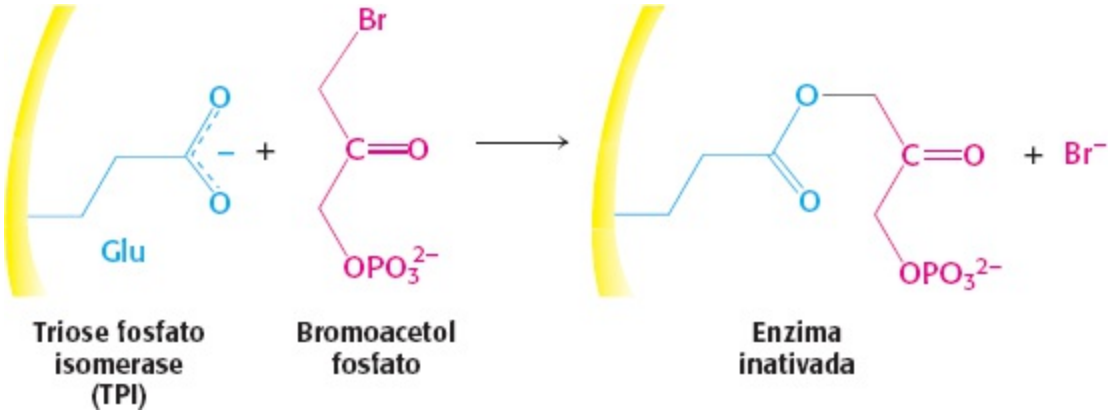


Figura 8.24 Fosfato de bromoacetol, um marcador de afinidade para a triose fosfato isomerase (TPI). O bromoacetol fosfato, um análogo da di-hidroxiacetona fosfato, liga-se ao sítio ativo da enzima e modifica de modo covalente um resíduo de ácido glutâmico necessário para a atividade enzimática.

Os *inibidores suicidas* ou *inibidores baseados no mecanismo* são substratos modificados que fornecem o meio mais específico de modificar o sítio ativo de uma enzima. O inibidor liga-se à enzima como um substrato e é inicialmente processado pelo mecanismo catalítico normal. Em seguida, o mecanismo de catálise gera um intermediário quimicamente reativo, que inativa a enzima por modificação covalente. O fato de que a enzima participa de sua própria inibição irreversível sugere fortemente que o grupo modificado de modo covalente na enzima é vital para a catálise. Um

exemplo desse tipo de inibidor é a *N,N*-dimetilpropargilamina, um inibidor da enzima monoamina oxidase (MAO). Um grupo prostético flavina da monoamina oxidase oxida a *N,N*-dimetilpropargilamina, que, por sua vez, inativa a enzima por meio de sua ligação ao N-5 do grupo prostético da flavina (Figura 8.25). A monoamina oxidase desamina neurotransmissores, como a dopamina e a serotonina, reduzindo seus níveis no cérebro. A doença de Parkinson está associada a baixos níveis de dopamina, enquanto a depressão está associada a baixos níveis de serotonina. O fármaco (–)deprenila, que é utilizado no tratamento da doença de Parkinson e na depressão, é um inibidor suicida da monoamina oxidase.

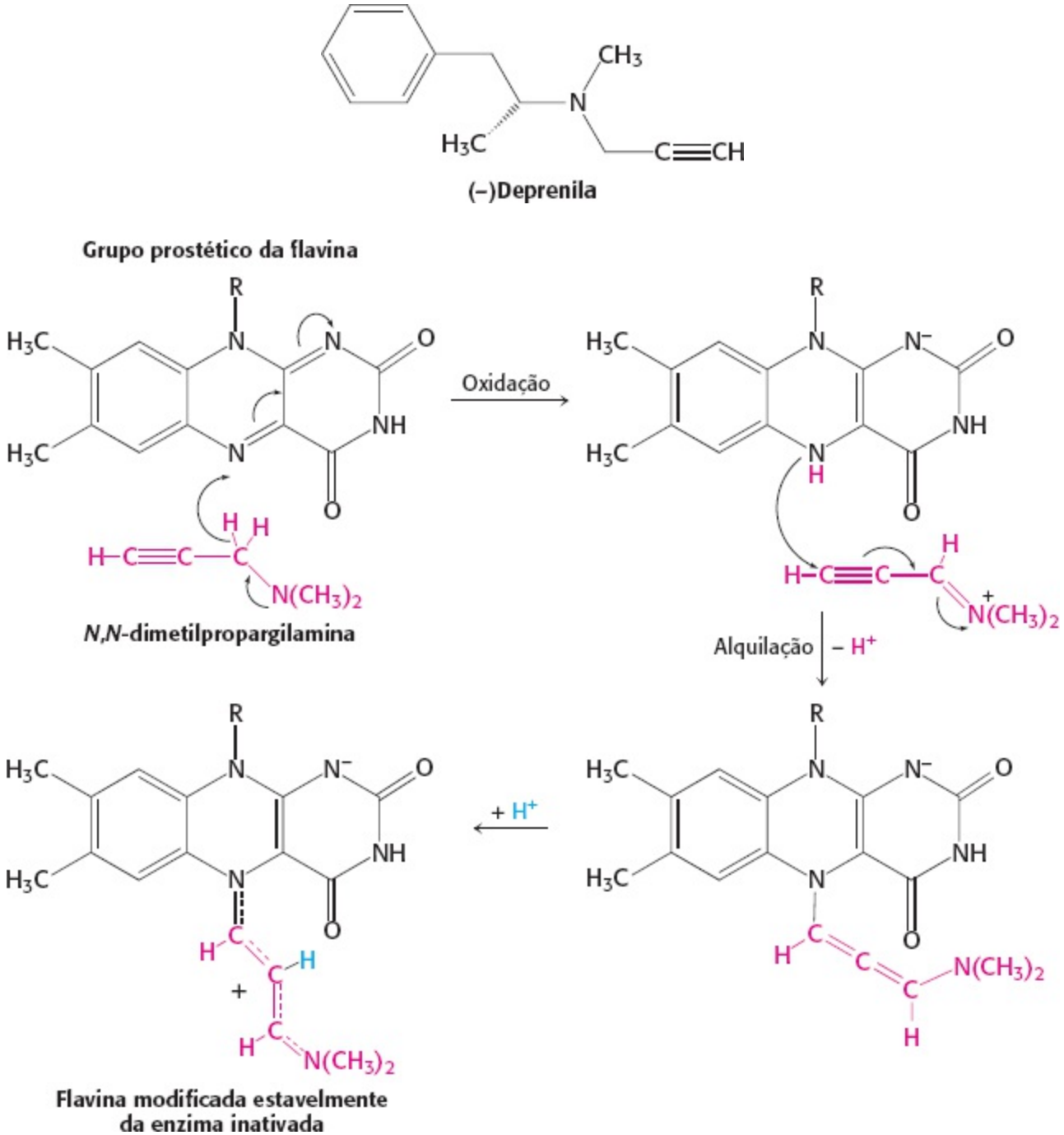


Figura 8.25 Inibição baseada no mecanismo (suicida). A monoamina oxidase, uma enzima importante na síntese de neurotransmissores, necessita do cofator FAD (flavina adenina dinucleotídio). A *N,N*-dimetilpropargilamina inibe a monoamina oxidase ao modificar de modo covalente o grupo prostético flavina apenas após a oxidação do inibidor. O produto de adição flavina N-5 é estabilizado pela adição de um próton. R representa o restante do grupo prostético da flavina.

Os análogos do estado de transição são potentes inibidores de enzimas

Consideremos agora os compostos que forneceram uma visão mais íntima do próprio processo catalítico. Em 1948, Linus Pauling propôs que compostos que se assemelham ao estado de transição de uma reação catalisada deveriam ser inibidores muito efetivos de enzimas. Esses miméticos são denominados *análogos de estado de transição.* A inibição da prolina racemase é um exemplo instrutivo. A racemização da prolina ocorre por meio de um estado de transição, em que o átomo de carbono α tetraédrico tornou-se triangular (Figura 8.26). Na forma triangular, todas as três ligações estão no mesmo plano; o C_α também apresenta uma carga negativa efetiva.

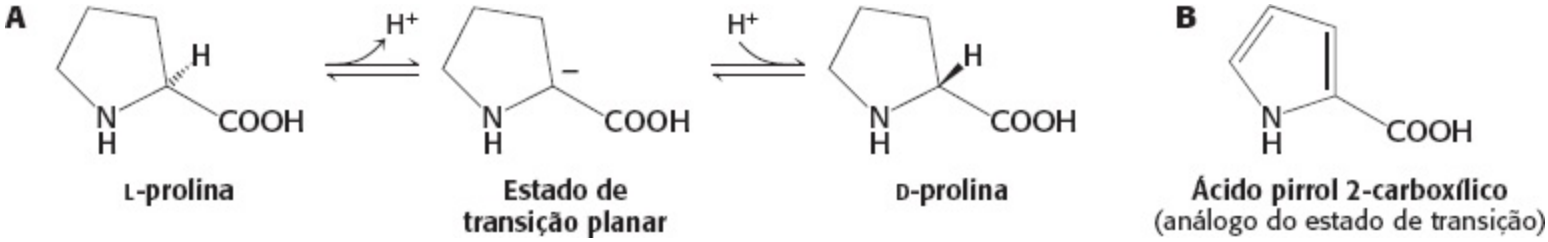


Figura 8.26 Inibição por análogos do estado de transição. A. A isomerização da L-prolina em D-prolina pela prolina racemase, uma enzima bacteriana, ocorre por meio de um estado de transição planar, em que o átomo de carbono α é triangular, em vez de tetraédrico. **B.** O ácido pirrol 2-carboxílico, um análogo do estado de transição em virtude de sua geometria triangular, é um potente inibidor da prolina racemase.

Esse carbânion simétrico pode ser novamente protonado em um lado, produzindo o isômero L, ou do outro lado, formando o isômero D. Esse quadro é sustentado pelo achado de que o inibidor pirrol 2-carboxilato liga-se à racemase 160 vezes mais fortemente do que a prolina. *O átomo de carbono α desse inibidor, à semelhança daquele do estado de transição, é triangular.* Seria de esperar que um análogo que também apresentasse uma carga negativa em Cα se ligasse ainda mais firmemente. Em geral, inibidores altamente potentes e específicos de enzimas podem ser produzidos pela síntese de compostos que se assemelham mais estreitamente ao estado de transição do que ao próprio substrato. O poder inibitório dos análogos do estado de transição ressalta a essência da catálise: *a ligação seletiva do estado de transição.*

Anticorpos catalíticos demonstram a importância da ligação seletiva do estado de transição para a atividade enzimática

Os anticorpos capazes de reconhecer os estados de transição devem funcionar como catalisadores, se entendemos bem a importância do estado de transição para a catálise. A preparação de um anticorpo que catalisa a inserção de um íon metal em uma porfirina ilustra muito bem a validade dessa abordagem. A ferroquelatase, a enzima final na via de biossíntese para a produção do heme, catalisa a inserção de Fe^{2+} na protoporfirina IX. A porfirina quase plana precisa ser curvada para que o ferro possa entrar.

O desafio era encontrar um análogo de estado de transição para essa reação de adição de metal que pudesse ser utilizado como antígeno (imunógeno) para gerar um anticorpo. A solução veio de estudos mostrando que uma porfirina alquilada, a *N*-metilmesoporfirina, é um potente inibidor da ferroquelatase. Esse composto assemelha-se ao estado de transição, visto que a N-*alquilação força a porfirina a se curvar.* Além disso, sabia-se que as *N*-alquilporfirinas quelam íons metálicos 10^4

vezes mais rapidamente do que os seus correspondentes não alquilados. A curvatura aumenta a exposição dos pares solitários de elétrons do nitrogênio pirrólico ao solvente, possibilitando a ligação do íon ferro.

Figura 8.27 A *N*-metilmesoporfirina é um análogo de estado de transição usado para gerar anticorpos catalíticos. A inserção de um íon metal em uma porfirina pela ferroquelatase ocorre por meio de um estado de transição, em que a porfirina se curva. A *N*-metilmesoporfirina, uma porfirina curva que se assemelha ao estado de transição da reação catalisada pela ferroquelatase, foi utilizada para gerar um anticorpo que também catalisa a inserção de um íon metálico em um anel de porfirina.

Foi produzido um anticorpo catalisador com o uso de uma *N*-alquilporfirina como antígeno. O anticorpo resultante presumivelmente distorce uma porfirina plana para facilitar a entrada de um íon metálico (Figura 8.27). Em média, uma molécula de anticorpo adicionou o metal a 80 moléculas de porfirina por hora, uma velocidade apenas 10 vezes menor que a da ferroquelatase, e 2.500 vezes maior que a reação não catalisada. *Os anticorpos catalíticos (abzymes; do inglês, antibody enzymes) podem, de fato, ser produzidos pelo uso de análogos de estado de transição como antígenos.* Por meio de estratégias semelhantes, foram produzidos anticorpos que catalisam muitos outros tipos de reações químicas–exemplificadas por hidrólise de ésteres e amidas, formação de ligação amida, transesterificação, clivagem fotoinduzida, dimerização fotoinduzida, descarboxilação e oxidação. Os estudos com análogos de estado de transição fornecem fortes evidências de que as enzimas podem funcionar ao assumir uma conformação no sítio ativo que seja complementar, na sua estrutura, ao estado de transição. *O poder dos análogos dos estados de transição é atualmente evidente: (1) constituem fontes de esclarecimento sobre os mecanismos catalíticos, (2) podem atuar como inibidores potentes e específicos de enzimas, e (3) podem ser usados como imunógenos para gerar uma ampla variedade de novos catalisadores.*

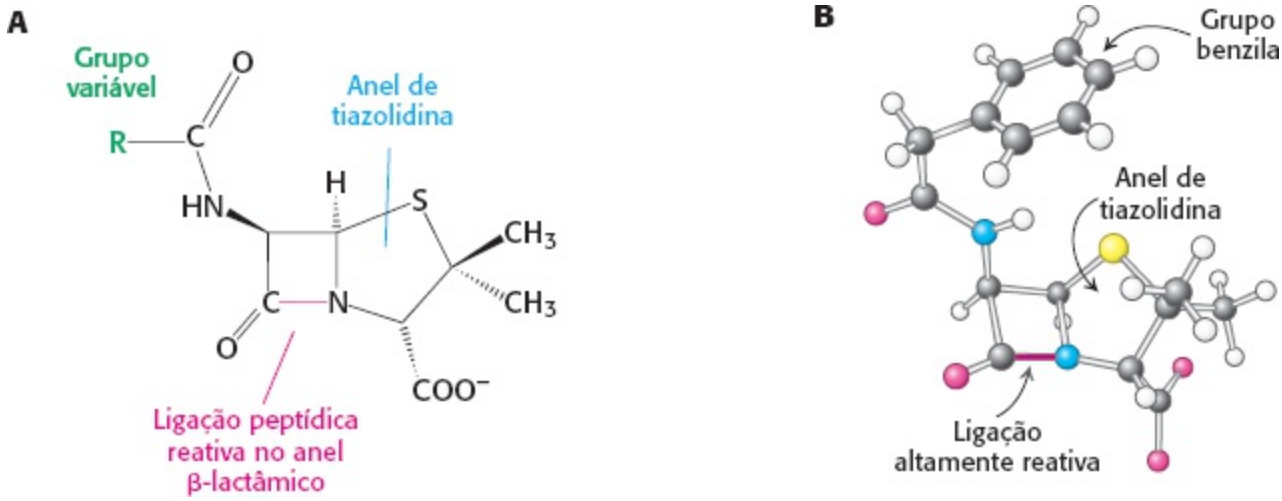


Figura 8.28 O sítio reativo da penicilina é a ligação peptídica de seu anel β– lactâmico. A. Fórmula estrutural da penicilina. **B.** Representação da benzilpenicilina.

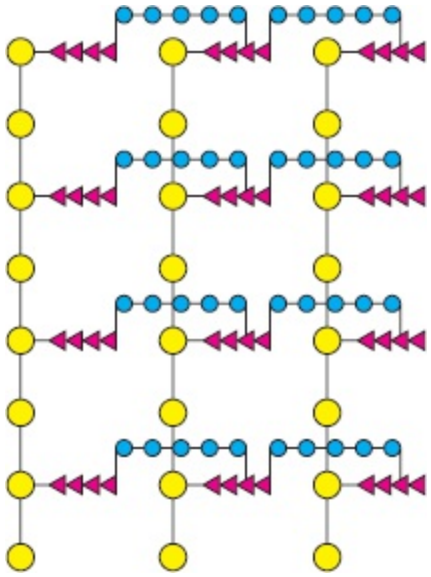


Figura 8.29 Representação esquemática do peptidoglicano no *Staphylococcus aureus.* Os açúcares são mostrados em amarelo, os tetrapeptídios em vermelho, e as pontes de pentaglicina, em azul. A parede celular é uma única macromolécula enorme em formato de bolsa, devido à sua extensa ligação cruzada.

A penicilina inativa irreversivelmente uma enzima essencial na síntese da parede celular bacteriana

A penicilina, o primeiro antibiótico descoberto, nos fornece um exemplo de um inibidor suicida clinicamente útil. A penicilina é constituída de um anel de tiazolidina, fusionado a um anel β–lactâmico, ao qual está ligado um grupo R variável por uma ligação peptídica (Figura 8.28A). Na benzilpenicilina, por exemplo, R é um grupo benzila (Figura 8.28B). Essa estrutura pode sofrer uma variedade de rearranjos, e, em particular, o anel β-lactâmico é muito lábil. Na realidade, essa instabilidade está estreitamente associada à ação antibiótica da penicilina, como ficará evidente adiante.

Como a penicilina inibe o crescimento bacteriano? Consideremos o *Staphylococcus aureus,* a causa mais comum de infecção estafilocócica. A penicilina atua interferindo na síntese das paredes celulares de *S. aureus*. A parede celular de *S. aureus* é constituída de uma macromolécula, denominada *peptidoglicano* (Figura 8.29), que é constituída de cadeias polissacarídicas lineares interligadas por peptídios pequenos (pentaglicinas e tetrapeptídios). O enorme peptidoglicano em forma de bolsa confere apoio mecânico e impede as bactérias de explodir em resposta à sua elevada pressão osmótica interna. A *glicopeptídio transpeptidase* catalisa a formação das ligações cruzadas responsáveis pela estabilidade do peptidoglicano (Figura 8.30). A parede celular bacteriana é singular pelo seu conteúdo de D aminoácidos, que formam ligações cruzadas por um mecanismo diferente daquele usado para a síntese de proteínas.

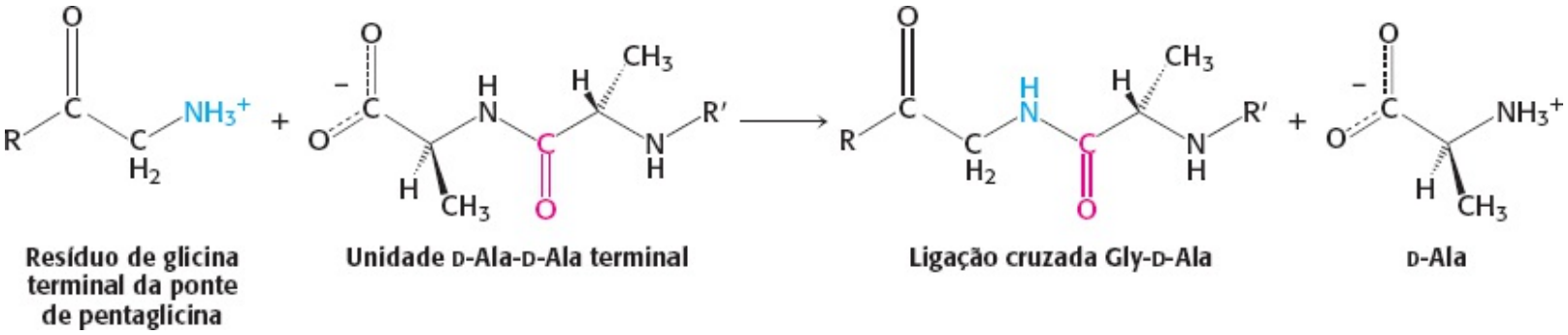


Figura 8.30 Formação de ligações cruzadas no peptidoglicano de *S. aureus*. O grupo aminoterminal da ponte de pentaglicina na parede celular ataca a ligação peptídica entre dois resíduos de D-alanina, formando uma ligação cruzada.

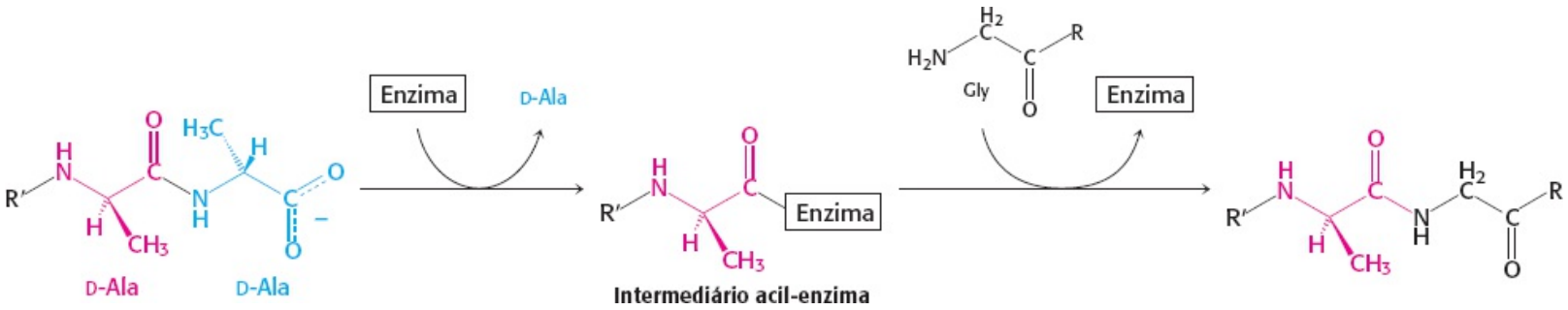


Figura 8.31 Reação de transpeptidação. Forma-se um intermediário acil-enzima na reação de transpeptidação que leva à formação de ligação cruzada.

A penicilina inibe a transpeptidase de ligação cruzada pelo estratagema do cavalo de Troia. A transpeptidase normalmente forma um *intermediário acila* como penúltimo resíduo de D-alanina do peptídio D-Ala-D-Ala (Figura 8.31). Esse intermediário covalente de acil-enzima reage então com o grupo amino da glicina terminal em outro peptídio, formando a ligação cruzada. A penicilina é bem recebida no sítio ativo da transpeptidase, visto que ela mimetiza a fração D-Ala-D-Ala do substrato normal (Figura 8.32). A penicilina ligada forma então uma ligação covalente com um resíduo de serina no sítio ativo da enzima. *Essa penicilil-enzima não reage mais. Por conseguinte, a transpeptidase é inibida irreversivelmente, e não pode ocorrer síntese da parede celular.*

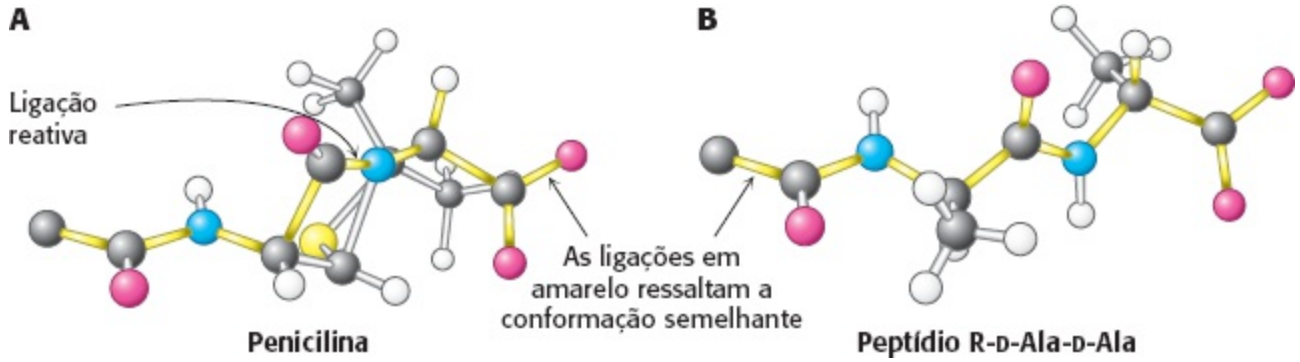


Figura 8.32 Conformações da penicilina e de um substrato normal. A conformação da penicilina na vizinhança de sua ligação peptídica reativa (**A**) assemelha-se à conformação postulada do estado de transição de R-D-Ala-D-Ala (**B**) na reação de transpeptidação. [Segundo B. Lee. *J. Mol. Biol.* 61:463-469, 1971.].

Por que a penicilina é um inibidor tão efetivo da transpeptidase? O anel β–lactâmico de quatro membros altamente tenso da penicilina a torna particularmente reativa. Ao se ligar à transpeptidase, o resíduo de serina no sítio ativo ataca o átomo de carbono carbonílico do anel lactâmico, formando

o derivado penicilil-serina (Figura 8.33). Como a peptidase participa de sua própria inativação, a penicilina atua como um inibidor suicida.

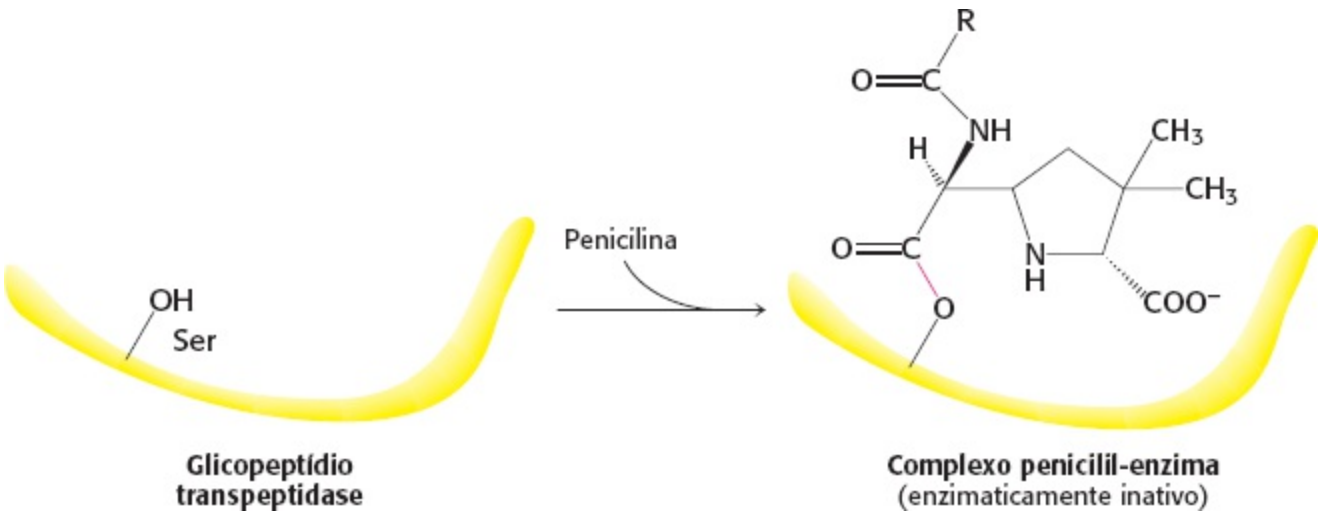


Figura 8.33 Formação de um complexo penicilil-enzima. A penicilina reage com a transpeptidase, formando um complexo inativo, que é indefinidamente estável.

8.6 As enzimas podem ser estudadas uma molécula de cada vez

Os experimentos que são realizados para determinar uma característica enzimática necessitam, em sua maioria, de uma preparação enzimática em uma solução tamponada. Até mesmo alguns microlitros dessa solução conterão milhões de moléculas de enzimas. Muito do que aprendemos sobre as enzimas até agora veio desses experimentos, denominados *estudos de conjuntos*. Uma suposição básica desses estudos é que todas as enzimas são as mesmas ou são muito semelhantes. Quando determinamos uma propriedade enzimática, como K_M, em estudos de conjunto, o valor é, necessariamente, médio para todas as enzimas presentes. Entretanto, sabemos que a heterogeneidade molecular, isto é, a capacidade de uma molécula de assumir, com o passar do tempo, várias estruturas distintas que diferem ligeiramente na sua estabilidade, é uma propriedade inerente de todas as grandes biomoléculas. Convém lembrar que os príons podem existir em duas estruturas diferentes, uma das quais é propensa à agregação (p. 58). Como podemos afirmar se essa heterogeneidade molecular afeta a atividade enzimática?

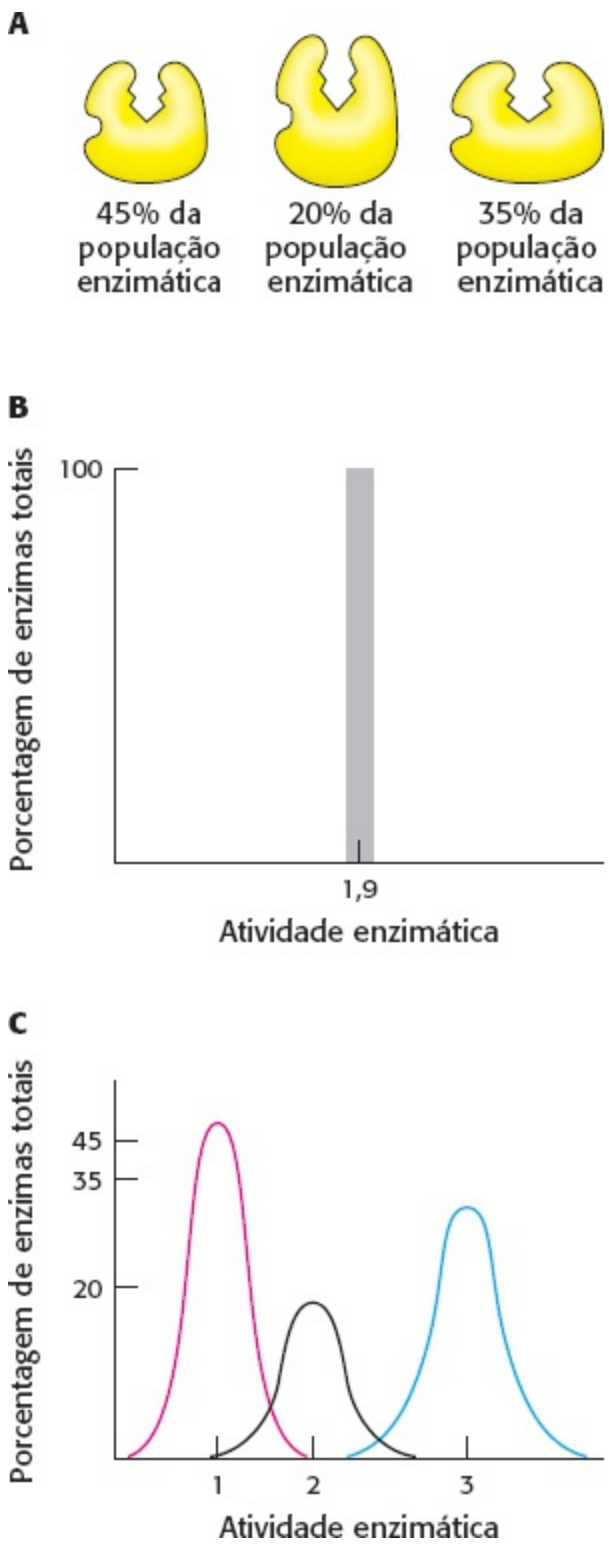


Figura 8.34 Os estudos de moléculas isoladas podem revelar a heterogeneidade molecular. **A.** Biomoléculas complexas, como as enzimas, exibem heterogeneidade molecular. **B.** Quando se avalia a propriedade de uma enzima utilizando métodos de conjunto, o resultado é um valor médio de todas as enzimas presentes. **C.** Os estudos de enzimas isoladas revelam a sua heterogeneidade molecular, com diferentes propriedades apresentadas pelas várias formas.

Como exemplo, consideremos uma situação hipotética. Um marciano visita a Terra para aprender sobre a educação superior. A espaçonave paira acima de uma universidade, e nosso marciano registra meticulosamente como a população de estudantes se movimenta no campus. Muita informação pode ser reunida a partir desses estudos: onde os estudantes tendem a estar em determinados momentos de determinados dias, que prédios são usados, quando e por quantos. Agora, suponhamos que nosso visitante tenha desenvolvido uma câmera de grande aumento, capaz de acompanhar um estudante durante todo o dia. Esses dados fornecerão uma perspectiva muito

diferente da vida universitária: O que esse estudante come? Com quem fala? Quanto tempo dedica ao estudo? Esse novo método *in singulo,* que examina um indivíduo de cada vez, fornece numerosas informações novas, mas também ilustra uma armadilha potencial ao estudar indivíduos, sejam eles estudantes ou enzimas: Como podemos ter certeza de que o estudante ou a molécula é um representante, e não um elemento isolado? Essa armadilha pode ser superada pelo estudo de um número suficiente de indivíduos para satisfazer a análise estatística quanto à sua validade.

Deixemos o nosso marciano com suas observações, e consideremos uma situação mais bioquímica. A Figura 8.34A mostra uma enzima que exibe heterogeneidade molecular, com três formas ativas que catalisam a mesma reação, porém em velocidades diferentes. Essas formas apresentam estabilidades ligeiramente diferentes, porém ruído térmico suficiente para interconverter as formas. Cada forma está presente como fração da população enzimática total, conforme indicado. Se fizéssemos um experimento para determinar a atividade enzimática em determinado conjunto de condições com o uso de métodos de conjunto, obteríamos um único valor, que representaria a média do conjunto heterogêneo (Figura 8.34B). Entretanto, se realizássemos um número suficiente de experimentos com uma molécula isolada, descobriríamos que a enzima tem três formas moleculares diferentes, com atividades muito distintas (Figura 8.34C). Além disso, essas diferentes formas mais provavelmente corresponderiam a diferenças bioquímicas importantes.

O desenvolvimento de técnicas poderosas – como *patch-clamp*, a fluorescência de moléculas isoladas e pinças ópticas – permitiu aos bioquímicos pesquisar as atuações de moléculas individuais. Examinaremos estudos de moléculas isoladas de canais de membrana com o uso de *patch clamp* (Seção 13.4), complexos de síntese de ATP com o uso de fluorescência de moléculas isoladas e motores moleculares com o uso de uma armadilha óptica (Seção 34.2). Os estudos de moléculas isoladas abrem uma nova visão sobre a função das enzimas, em particular, e sobre todas as grandes biomoléculas, em geral.

Resumo

8.1 As enzimas são catalisadores poderosos e altamente específicos

Os catalisadores nos sistemas biológicos são, em sua maioria, enzimas, e quase todas as enzimas são proteínas. As enzimas são altamente específicas e apresentam grande poder de catálise. Podem aumentar a velocidade das reações por um fator de 10^6 ou mais. Muitas enzimas necessitam de cofatores para a sua atividade. Esses cofatores podem ser íons metálicos ou pequenas moléculas orgânicas derivadas de vitaminas, denominadas coenzimas.

8.2 A energia livre é uma função termodinâmica útil para o entendimento das enzimas

A energia livre (G) constitui a função termodinâmica mais valiosa para determinar se uma reação pode ocorrer e para entender a energética da catálise. Uma reação pode ocorrer espontaneamente apenas se a variação na energia livre (ΔG) for negativa. A variação de energia livre de uma reação que ocorre quando os reagentes e os produtos estão em atividade unitária é denominada variação padrão de energia livre ($\Delta G°$). Em bioquímica, utiliza-se habitualmente $\Delta G^{o'}$, a variação padrão de energia livre em pH 7. As enzimas não alteram os equilíbrios das reações; na verdade, elas aumentam as velocidades das reações.

8.3 As enzimas aceleram reações, facilitando a formação do estado de transição

As enzimas servem como catalisadores ao diminuir a energia livre de ativação das reações químicas. As enzimas aceleram as reações, fornecendo uma via de reação em que o estado de transição (a forma química de maior energia) apresenta uma energia livre mais baixa e, portanto, é formado mais rapidamente do que na reação não catalisada.

O primeiro passo na catálise consiste na formação de um complexo enzima-substrato. Os substratos ligam-se às enzimas em fendas de sítios ativos, a partir das quais a água é, em grande parte, excluída quando o substrato é ligado. A especificidade das interações enzima-substrato decorre principalmente de pontes de hidrogênio, que são direcionais, e do formato do sítio ativo, que rejeita as moléculas que não apresentam uma forma suficientemente complementar. O reconhecimento de substratos pelas enzimas é frequentemente acompanhado de mudanças conformacionais nos sítios ativos, e essas mudanças facilitam a formação do estado de transição.

8.4 A equação de Michaelis-Menten descreve as propriedades cinéticas de muitas enzimas

As propriedades cinéticas de muitas enzimas são descritas pela equação de Michaelis-Menten. Nessa equação, uma enzima (E) combina-se com um substrato (S), formando um complexo enzima-substrato (ES), que pode prosseguir para formar um produto (P) ou se dissociar em E e S.

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

A velocidade V_0 de formação do produto é dada pela equação de Michaelis-Menten:

$$V_0 = V_{máx.} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

em que $V_{máx.}$ é a velocidade da reação quando a enzima está totalmente saturada com substrato, e K_M, a constante de Michaelis, é a concentração de substrato em que a velocidade da reação é metade da velocidade máxima. A velocidade máxima, $V_{máx.}$, é igual ao produto de k_2 ou k_{cat}, pela concentração total da enzima. A constante de cinética k_{cat}, denominada número de renovação, é o número de moléculas de substrato convertidas em produto por unidade de tempo, em um único sítio catalítico, quando a enzima está totalmente saturada com substrato. O número de renovação para a maioria das enzimas situa-se entre 1 e 10^4 por segundo. A razão k_{cat}/K_M fornece uma sonda penetrante na eficiência das enzimas.

As enzimas alostéricas constituem uma importante classe de enzimas, cuja atividade catalítica pode ser regulada. Essas enzimas, que não adotam a cinética de Michaelis-Menten, apresentam múltiplos sítios ativos. Esses sítios ativos exibem cooperatividade, conforme evidenciado por uma dependência sigmoide da velocidade da reação na concentração de substrato.

8.5 As enzimas podem ser inibidas por moléculas específicas

Pequenas moléculas ou íons específicos podem inibir até mesmo enzimas não alostéricas. Na inibição irreversível, o inibidor está ligado de modo covalente à enzima, ou está ligado tão

firmemente que a sua dissociação da enzima é muito lenta. Os inibidores covalentes fornecem um meio de mapear o sítio ativo da enzima. Em contrapartida, a inibição reversível caracteriza-se por um equilíbrio mais rápido entre enzima e inibidor. Um inibidor competitivo impede a ligação do substrato ao sítio ativo. Ele reduz a velocidade da reação, diminuindo a proporção de moléculas de enzima que estão ligadas ao substrato. A inibição competitiva pode ser superada pelo aumento da concentração de substrato. Na inibição incompetitiva, o inibidor só se combina com o complexo enzima-substrato. Na inibição não competitiva, o inibidor diminui o número de renovação. A inibição incompetitiva e a inibição não competitiva não podem ser superadas pelo aumento da concentração de substrato.

A essência da catálise consiste na estabilização seletiva do estado de transição. Assim, uma enzima liga-se ao estado de transição mais firmemente do que ao substrato. Os análogos do estado de transição são compostos estáveis que mimetizam características-chave dessa forma química de maior energia. Trata-se de inibidores potentes e específicos de enzimas. A prova de que a estabilização do estado de transição constitui um aspecto essencial da atividade enzimática vem da produção de anticorpos catalíticos. Os análogos do estado de transição são utilizados como antígenos ou imunógenos, na produção de anticorpos catalíticos.

8.6 As enzimas podem ser estudadas uma molécula de cada vez

Hoje em dia, muitas enzimas estão sendo estudadas *in singulo,* ao nível de uma única molécula. Esses estudos são importantes, uma vez que fornecem informações de difícil obtenção nos estudos de populações de moléculas. Os métodos de molécula isolada revelam uma distribuição das características da enzima, mais do que um valor médio, como é obtido com o uso dos métodos de conjunto.

Apêndice: As enzimas são classificadas com base nos tipos de reações que catalisam

Muitas enzimas têm nomes comuns que fornecem pouca informação sobre as reações que elas catalisam. Por exemplo, uma enzima proteolítica secretada pelo pâncreas é denominada tripsina. As outras enzimas são denominadas, em sua maioria, com base nos seus substratos e nas reações que elas catalisam, com a adição do sufixo "ase". Assim, uma peptídio hidrolase é uma enzima que hidrolisa ligações peptídicas, enquanto a ATP sintase é uma enzima que sintetiza ATP.

Para proporcionar alguma coerência na classificação das enzimas, a International Union of Biochemistry, em 1964, estabeleceu uma Comissão de Enzimas para desenvolver uma nomenclatura para as enzimas. As reações foram divididas em seis grupos principais, numerados de 1 a 6 (Tabela 8.8). Esses grupos foram subdivididos e ainda mais subdivididos, de modo que uma sequência de quatro números, precedida pelas letras *EC,* de *Enzyme Commission*, pudesse identificar com precisão todas as enzimas.

Consideremos como exemplo a nucleosídio monofosfato (NMP) quinase, uma enzima que examinaremos detalhadamente na Seção 9.4. Ela catalisa a seguinte reação:

$$\text{ATP} + \text{NMP} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{NDP}$$

Tabela 8.8 As seis classes principais de enzimas.

Classe	Tipo de reação	Exemplo	Capítulo
1. Oxidorredutases	Oxidorredução	Lactato desidrogenase	16
2. Transferases	Transferência de grupo	Nucleosídio monofosfato quinase (NMP quinase)	9
3. Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)	Quimiotripsina	9
4. Liases	Adição ou remoção de grupos para formar duplas ligações	Fumarase	17
5. Isomerases	Isomerização (transferência intramolecular de grupos)	Triose fosfato isomerase	16
6. Ligases	Ligação de dois substratos à custa da hidrólise de ATP	Aminoacil-tRNA sintetase	30

A NMP quinase transfere um grupo fosforila do ATP para o NMP, formando um nucleosídio difosfato (NDP) e ADP. Em consequência, trata-se de uma transferase ou membro do grupo 2. Muitos grupos, além do grupo fosforila, como açúcares e unidades de um carbono, podem ser transferidos. As transferases que deslocam um grupo fosforila são designadas como 2.7. Vários grupos funcionais podem aceitar o grupo fosforila. Se o aceptor for um fosfato, a transferase é designada como 2.7.4. O número final designa o aceptor de modo mais preciso. Quanto à NMP quinase, o aceptor é um nucleosídio monofosfato, e a designação da enzima é EC 2.7.4.4. Embora os nomes comuns sejam usados de modo rotineiro, o número de classificação é usado quando a identidade precisa da enzima pode ser ambígua.

Palavras-chave

análogo do estado de transição (p. 245)
anticorpo catalítico (*abzyme*) (p. 246)
apoenzima (p. 223)
coenzima (p. 223)
cofator (p. 223)
encaixe induzido (p. 230)
energia livre (p. 224)
energia livre de ativação (p. 224)
enzima (p. 222)
enzima alostérica (p. 239)
equação de Michaelis-Menten (p. 234)
estado de transição (p. 227)
gráfico de Lineweaver-Burk (gráfico de dupla-recíproca) (p. 235)
grupo prostético (p. 223)
holoenzima (p. 223)
inibição baseada no mecanismo (suicida) (p. 244)

inibição competitiva (p. 240)
inibição incompetitiva (p. 240)
inibição não competitiva (p. 240)
K_M (constante de Michaelis) (p. 233)
marcador de afinidade (análogo de substrato reativo) (p. 243)
número de renovação (p. 236)
razão k_{cat}/K_M (p. 237)
reação de duplo deslocamento (em pingue-pongue) (p. 239)
reação sequencial (p. 238)
reagente específico de grupo (p. 243)
sítio ativo (p. 229)
substrato (p. 222)
$V_{máx.}$ (velocidade máxima) (p. 234)

Questões

1. *Raisons d'être.* Quais são as duas propriedades das enzimas que as tornam catalisadores particularmente úteis?

2. *Parceiros.* De que uma apoenzima necessita para se tornar uma holoenzima?

3. *Diferentes parceiros.* Quais são os dois tipos principais de cofatores?

4. *Vitaminas diárias*. Por que as vitaminas são necessárias para ter uma boa saúde?

5. *Uma função de estado.* Qual o mecanismo fundamental usado pelas enzimas para aumentar a velocidade das reações químicas?

6. *Esconderijos e frestas.* Qual a base estrutural para a especificidade das enzimas?

7. *Entrega com uma mão e retirada com a outra.* Por que a energia de ativação de uma reação não aparece ΔG final da reação?

8. *Escalando a montanha.* As proteínas são termodinamicamente instáveis. ΔG da hidrólise de proteínas é muito negativa; todavia, as proteínas podem ser muito estáveis. Explique esse aparente paradoxo. O que ele revela acerca da síntese de proteínas?

9. *Proteção.* Sugira por que a enzima lisozima, que degrada as paredes celulares de algumas bactérias, está presente nas lágrimas.

10. *Questão de estabilidade.* Os análogos do estado de transição, que podem ser usados como inibidores enzimáticos e para gerar anticorpos catalíticos, são frequentemente difíceis de sintetizar. Sugira uma razão para isso.

11. *Associação.* Associe os valores K'_{eq} com os valores corretos de $\Delta G^{o'}$.

	K'_{eq}	$\Delta G^{o'}$ (kJ mol^{-1})
(a)	1	28,53
(b)	10^{-5}	−11,42

(c)	10^4	5,69
(d)	10^2	0
(e)	10^{-1}	−22,84

12. *Energia livre!* Suponhamos que você tenha uma solução de glicose 6-fosfato 0,1 M. A essa solução, você adiciona a enzima fosfoglicomutase, que catalisa a seguinte reação:

$$\text{Glicose 6-fosfato} \overset{\text{Fosfoglicomutase}}{\rightleftharpoons} \text{glicose 1-fosfato}$$

$\Delta G^{o'}$ para a reação é de +7,5 kJ mol^{-1} (+1,8 kcal mol^{-1}).

(a) A reação ocorre como ela está escrita? Se a resposta for sim, quais são as concentrações finais de glicose 6-fosfato e glicose 1-fosfato?

(b) Em que condições celulares você poderia produzir glicose 1-fosfato em alta velocidade?

13. *Também energia livre!* Considere a seguinte reação:

$$\text{Glicose 1-fosfato} \rightleftharpoons \text{glicose 6-fosfato}$$

Após misturar reagente e produto e deixar alcançar o equilíbrio a 25°C, foi medida a concentração de cada composto:

$$[\text{Glicose 1-fosfato}]_{eq} = 0{,}01 \text{ M}$$

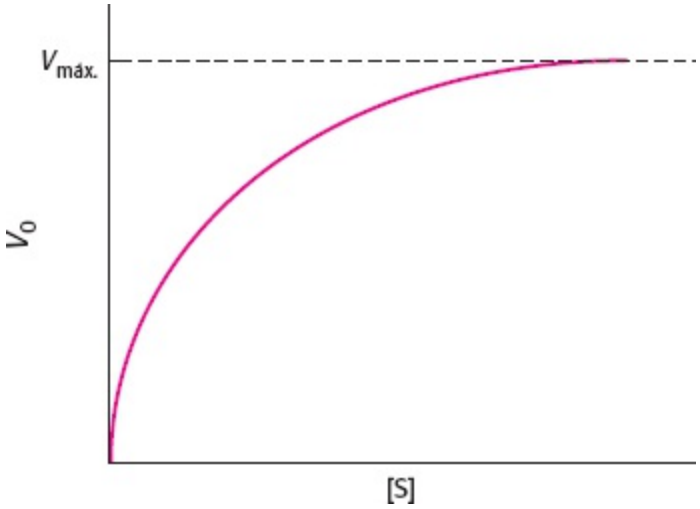
$$[\text{Glicose 6-fosfato}]_{eq} = 0{,}19 \text{ M}$$

Calcule K_{eq} e $\Delta G^{o'}$.

14. *Mantendo-se ocupado.* Muitas enzimas isoladas, quando incubadas a 37°C, sofrerão desnaturação. Entretanto, se essas enzimas forem incubadas a 37°C na presença de substrato, elas se tornarão cataliticamente ativas. Explique esse paradoxo aparente.

15. *Ativo, mas também responsivo.* Qual é a vantagem bioquímica de ter um K_M aproximadamente igual à concentração de substrato normalmente disponível para uma enzima?

16. *Bioquímicos irritados.* Muitos bioquímicos se irritam, de modo justificável, quando se deparam com um gráfico de Michaelis-Menten como o mostrado a seguir. Para descobrir o motivo, determine V_0 como uma fração de $V_{máx.}$, quando a concentração de substrato é igual a 10 K_M e 20 K_M. Por favor, controle sua indignação.



17. *Força motriz hidrolítica.* A hidrólise do pirofosfato a ortofosfato é importante para impulsionar reações de biossíntese, como a síntese de DNA. Essa reação hidrolítica é catalisada, na *Escherichia coli,* por uma pirofosfatase, que tem uma massa de 120 kDa e é constituída de seis subunidades idênticas. Para essa enzima, uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 10 μmol de pirofosfato em 15 min a 37°C, em condições padrões de ensaio. A enzima purificada tem uma $V_{máx.}$ de 2.800 unidades por miligrama de enzima.

(a) Quantos moles de substrato são hidrolisados por segundo por miligrama de enzima quando a concentração de substrato é muito maior do que o K_M?

(b) Quantos moles de sítios ativos existem em 1 mg de enzima? Suponha que cada subunidade tenha um sítio ativo.

(c) Qual o número de renovação da enzima? Compare este valor com outros mencionados neste capítulo.

18. *Destruindo o cavalo de Troia.* A penicilina é hidrolisada e, assim, inativada pela penicilinase (também conhecida como β–lactamase), uma enzima presente em algumas bactérias resistentes à penicilina. A massa dessa enzima no *Staphylococcus aureus* é de 29,6 kDa. A quantidade de penicilina hidrolisada em 1 min em 10 m*l* de uma solução contendo 10^{-9} g de penicilinase purificada foi medida em função da concentração de penicilina. Suponha que a concentração de penicilina não varie de modo apreciável durante o ensaio.

[Penicilina] μM	Quantidade hidrolisada (nmol)
1	0,11
3	0,25
5	0,34
10	0,45
30	0,58
50	0,61

(a) Represente graficamente V_0 e [S] e $1/V_0$ *versus* 1/[S] para esses dados. A penicilinase parece obedecer à cinética de Michaelis-Menten? Se for o caso, qual é o valor de K_M?

(b) Qual é o valor de $V_{máx}$?

(c) Qual é o número de renovação da penicilinase nessas condições experimentais? Suponha a existência de um sítio ativo por molécula de enzima.

19. *Contraponto.* A penicilinase (β-lactamase) hidrolisa a penicilina. Compare a penicilinase com a glicopeptídio transpeptidase.

20. *Um modo diferente.* A cinética de uma enzima é medida em função da concentração de substrato, na presença e na ausência de 100 μM de inibidor.

(a) Quais são os valores de $V_{máx.}$ e de K_M na ausência desse inibidor?

(b) Que tipo de inibição é esta?

(c) Qual é a constante de dissociação desse inibidor?

	Velocidade (μmol minuto−1)	
[S] (μM)	Ausência de inibidor	Presença de inibidor
3	10,4	2,1
5	14,5	2,9
10	22,5	4,5
30	33,8	6,8
90	40,5	8,1

(d) Se [S] = 30 μM, que fração das moléculas da enzima apresenta um substrato ligado na presença e na ausência de 100 μM do inibidor?

21. *Uma nova visão.* O gráfico de $1/V_0$ *versus* 1/[S] é algumas vezes denominado gráfico de Lineweaver-Burk. Outra maneira de expressar os dados cinéticos consiste em representar graficamente V_0 *versus* V_0/[S], que é conhecido como gráfico de Eadie-Hofstee.

(a) Rearranje a equação de Michaelis-Menten para demonstrar V_0 em função de V_0/[S].

(b) Qual é o significado da inclinação, da interseção vertical e da interseção horizontal em um gráfico de V_0 *versus* V_0/[S]?

(c) Faça um esboço do gráfico de V_0 *versus* V_0/[S] na ausência de um inibidor, na presença de um inibidor competitivo e na presença de um inibidor não competitivo.

22. *Substratos competidores.* Suponha que dois substratos, A e B, entrem em competição por uma enzima. Deduza uma expressão que relacione a razão das velocidades de utilização de A e B, V_A/V_B, com as concentrações desses substratos e seus valores de k_{cat} e K_M. (Dica: Expresse V_A em função de k_{cat}/K_M para o substrato A, e faça o mesmo para V_B.) A especificidade é determinada apenas por K_M?

23. *Um mutante tenaz.* Suponha que uma enzima mutante se ligue a um substrato 100 vezes mais firmemente do que a enzima nativa. Qual o efeito dessa mutação sobre a velocidade de catálise, se a ligação do estado de transição não for afetada?

24. *Mais Michaelis-Menten.* Para uma enzima que obedece à cinética simples de Michaelis-Menten, qual é o valor de $V_{máx.}$ se V_0 for igual a 1 μmol minuto^{-1} a 10 K_M?

25. *Paralisia controlada.* A succinilcolina é um relaxante muscular de ação rápida e curta duração, que é usado quando se introduz um tubo na traqueia de um paciente, ou quando se utiliza um broncoscópio para examinar a traqueia e os brônquios à procura de sinais de câncer. Dentro de poucos segundos após a administração de succinilcolina, o paciente sofre paralisia muscular e é colocado em um respirador enquanto o exame está sendo realizado. A succinilcolina é um inibidor competitivo da acetilcolinesterase, uma enzima do sistema nervoso, e essa inibição provoca paralisia. Entretanto, a succinilcolina é hidrolisada pela colinesterase sérica, que apresenta uma especificidade de substrato mais ampla do que a enzima do sistema nervoso. A paralisia dura até que a succinilcolina seja hidrolisada pela colinesterase sérica, habitualmente dentro de vários minutos.

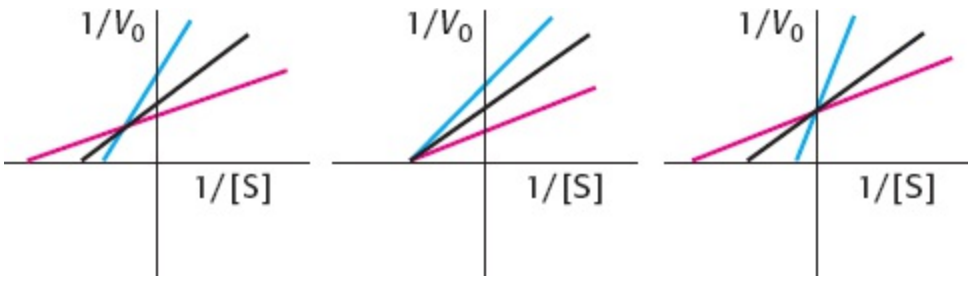
(a) Como medida de segurança, a colinesterase sérica é determinada antes da realização do exame. Explique por que essa medição é uma boa ideia.

(b) O que poderia acontecer ao paciente se a atividade da colinesterase sérica fosse apenas de 10 unidades de atividade por litro, em lugar da atividade normal de cerca de 80 unidades?

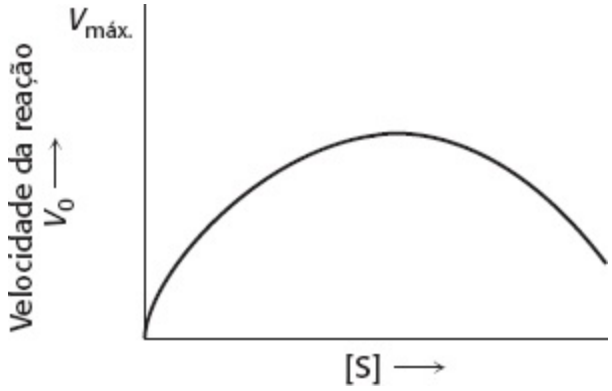
(c) Alguns pacientes apresentam uma forma mutante da colinesterase sérica, que exibe um K_M de 10 mM, em lugar do valor normal de 1,4 mM. Qual será o efeito dessa mutação sobre o paciente?

Questões | Interpretação de dados

26. *Variando a enzima.* Para uma reação catalisada por enzima com um substrato, foram determinados os traçados de dupla-recíproca para três concentrações diferentes da enzima. Qual das três famílias de curvas apresentadas a seguir você esperaria obter? Explique.



27. *Bom demais.* Uma enzima simples de tipo Michaelis-Menten, na ausência de inibidor, apresentou o seguinte comportamento cinético. O valor esperado de $V_{máx.}$ é mostrado no eixo y no gráfico a seguir.



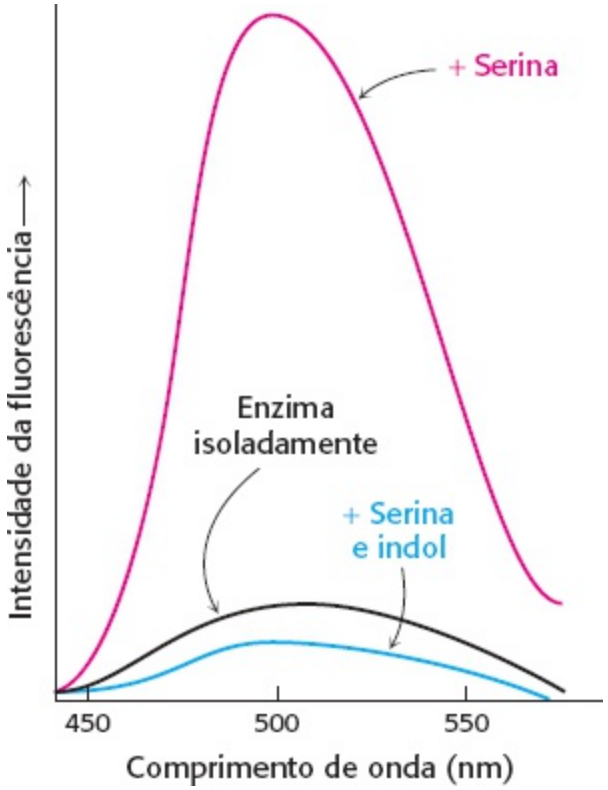
(a) Trace um gráfico de dupla-recíproca que corresponda à curva de velocidade *versus* substrato.

(b) Explique os resultados cinéticos.

28. *Etapa limitante da velocidade.* Na conversão de A em D na via bioquímica a seguir, as enzimas E_A, E_B e E_C têm os valores de K_M indicados abaixo de cada enzima. Se todos os substratos e produtos estiverem presentes em uma concentração de 10^{-4} M, e as enzimas tiverem aproximadamente a mesma $V_{máx.}$, qual etapa será limitante da velocidade e por quê?

$$\begin{array}{ccccccc} & & \mathrm{A} & \underset{\mathrm{E_A}}{\rightleftharpoons} & \mathrm{B} & \underset{\mathrm{E_B}}{\rightleftharpoons} & \mathrm{C} \quad \underset{\mathrm{E_C}}{\rightleftharpoons} \quad \mathrm{D} \\ K_M = & & 10^{-2}\ \mathrm{M} & & 10^{-4}\ \mathrm{M} & & 10^{-4}\ \mathrm{M} \end{array}$$

29. *Luminosidade colorida.* O triptofano sintetase, uma enzima bacteriana que contém um grupo prostético de piridoxal fosfato (PLP), catalisa a síntese de L-triptofano a partir da L-serina e de um derivado indólico. A adição de L-serina à enzima produz um acentuado aumento na fluorescência do grupo PLP, como mostra o gráfico anexo. A adição subsequente de indol, o segundo substrato, diminui essa fluorescência para um nível ainda menor do que aquele produzido pela enzima isoladamente. Como essas mudanças de fluorescência sustentam o conceito de que a enzima interage diretamente com seus substratos?



Questões | Integração de capítulos

30. *Experimento de titulação.* Foi examinado o efeito do pH sobre a atividade de uma enzima. Em seu sítio ativo, a enzima apresenta um grupo ionizável, que precisa estar com carregado negativamente para que haja a ligação do substrato e a ocorrência de catálise. O grupo ionizável tem um pK_a de 6,0. O substrato tem carga positiva em toda a faixa de pH do experimento.

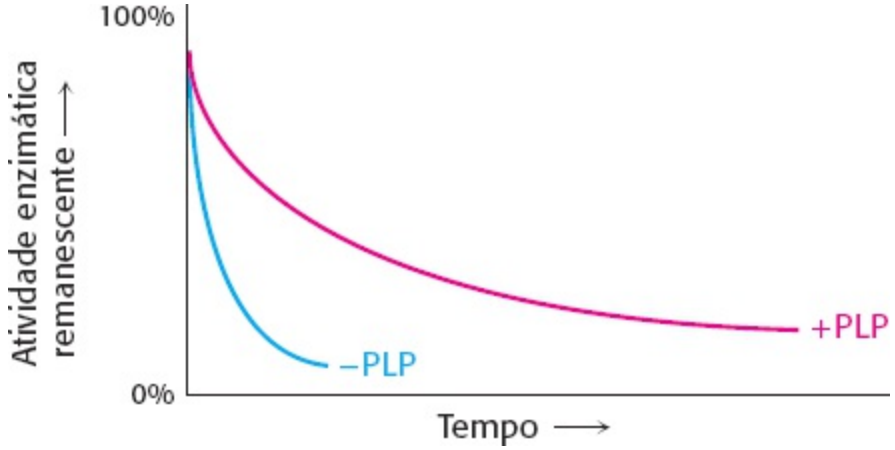
$$\begin{array}{ccc} E + S^+ & \rightleftharpoons & E - S^+ \longrightarrow E^- + P^+ \\ + & & \\ H^+ & & \\ \Updownarrow & & \\ EH & & \end{array}$$

(a) Trace a curva de V_0 *versus* pH quando a concentração de substrato é muito maior do que o K_M da enzima.

(b) Trace a curva de V_0 *versus* pH quando a concentração de substrato é muito menor que o K_M da enzima.

(c) Em que pH a velocidade será igual à metade da velocidade máxima passível de ser alcançada nessa condição?

31. *Uma questão de estabilidade.* O piridoxal fosfato (PLP) é uma coenzima para a enzima ornitina aminotransferase. A enzima foi purificada a partir de células cultivadas em meios com deficiência de PLP, bem como a partir de células cultivadas em meios contendo piridoxal fosfato. A estabilidade da enzima foi então medida, incubando-se a enzima a 37°C e determinando a quantidade de atividade enzimática remanescente. Foram obtidos os seguintes resultados:

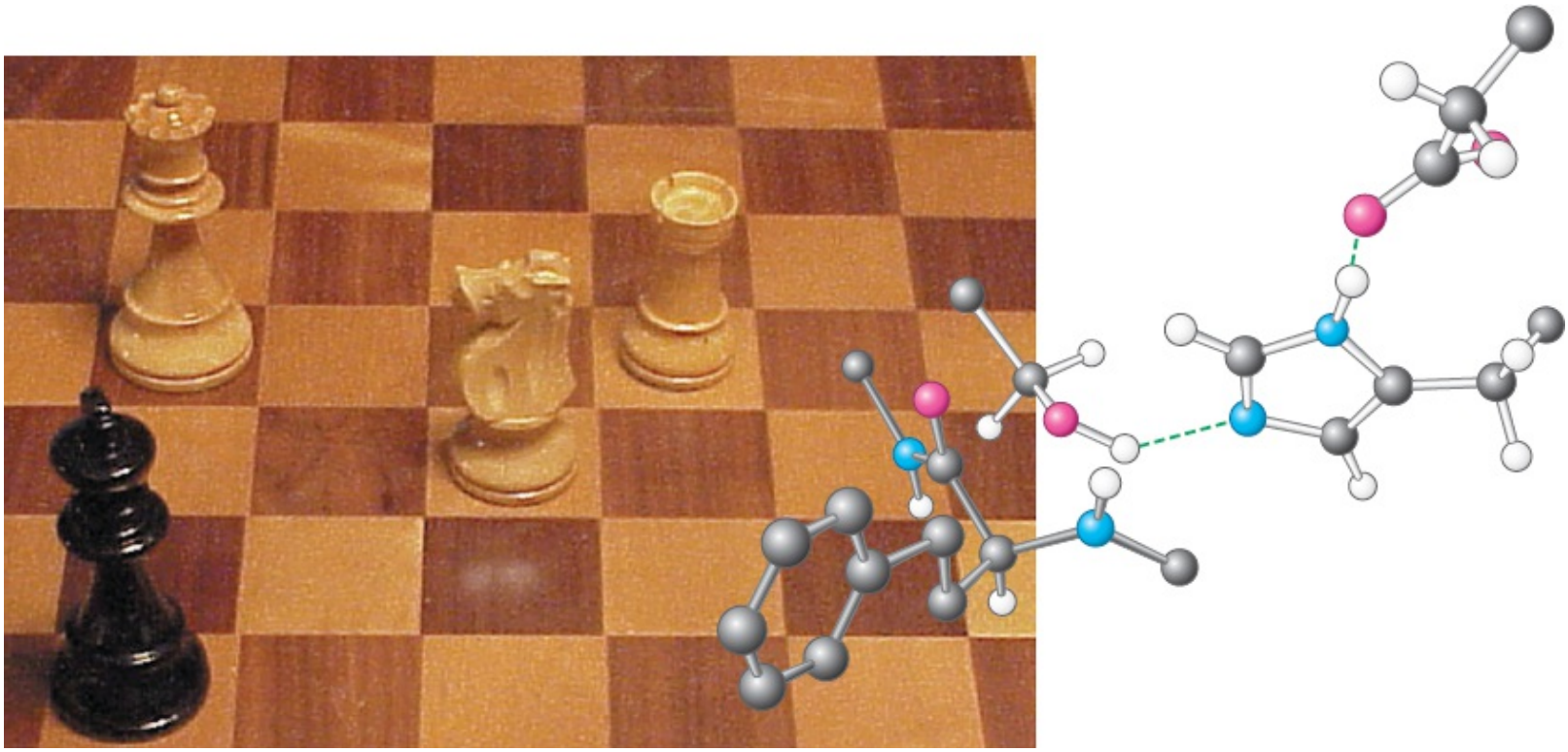


(a) Por que a quantidade de enzima ativa diminui com o tempo de incubação?

(b) Por que a quantidade de enzima das células com deficiência de PLP declina mais rapidamente?

Estratégias de Catálise

9



A estratégia é uma arte comum ao jogo de xadrez, em que é conscientemente planejada, e à ação das enzimas, para a qual é selecionada pela evolução. Os três resíduos de aminoácidos à direita, denotados pelas ligações brancas, constituem uma tríade catalítica encontrada no sítio ativo de uma classe de enzimas que clivam ligações peptídicas. O substrato, representado pela molécula com ligações em preto, foi irremediavelmente capturado, como o rei na fotografia de um jogo de xadrez, à esquerda, e inevitavelmente será clivado. [Fotografia cortesia de Wendie Berg.]

SUMÁRIO

9.1 As proteases facilitam uma reação fundamentalmente difícil

9.2 As anidrases carbônicas aceleram uma reação rápida

9.3 As enzimas de restrição catalisam reações de clivagem do DNA altamente específicas

9.4 As miosinas aproveitam mudanças conformacionais das enzimas para acoplar a hidrólise do ATP ao trabalho mecânico

Quais são as fontes do poder catalítico e da especificidade das enzimas? Neste capítulo apresentaremos as estratégias de catálise utilizadas por quatro classes de enzimas: as serina proteases, as anidrases carbônicas, as endonucleases de restrição e as miosinas. Cada classe catalisa reações que necessitam da adição de água a um substrato. Os mecanismos dessas enzimas foram revelados pelo uso de sondas experimentais precisas, incluindo as técnicas de determinação da estrutura das proteínas (Capítulo 3) e mutagênese sítio-dirigida (Capítulo 5). Os mecanismos ilustram muitos princípios importantes da catálise. Veremos como essas enzimas facilitam a formação do

estado de transição por meio do uso de energia de ligação e de encaixe induzido, bem como diversos tipos de estratégias específicas de catálise.

Cada uma das quatro classes de enzimas apresentadas neste capítulo ilustra o uso dessas estratégias para a solução de diferentes problemas. Para as serina proteases, exemplificadas pela quimiotripsina, o desafio é promover uma reação quase incomensuravelmente lenta em pH neutro na ausência de catalisador. Para as anidrases carbônicas, o desafio é alcançar uma alta velocidade absoluta de reação, apropriada para a integração a outros processos fisiológicos rápidos. Para as endonucleases de restrição, como a *Eco*RV, o desafio é alcançar um alto grau de especificidade. Por fim, para as miosinas, o desafio é utilizar a energia livre associada à hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) para acionar outros processos. Cada um dos exemplos selecionados é um membro de uma grande classe de proteínas. Para cada uma dessas classes, a comparação entre os membros da classe revela como os sítios ativos das enzimas evoluíram e foram aprimorados. Por conseguinte, as comparações estruturais e de mecanismo de ação enzimática constituem fontes de descobertas na história evolutiva das enzimas. Além disso, nosso conhecimento das estratégias catalíticas tem sido empregado no desenvolvimento de aplicações práticas, incluindo fármacos potentes e inibidores enzimáticos específicos. Por fim, embora neste capítulo não consideremos explicitamente as moléculas de RNA catalíticas, os princípios também se aplicam a esses catalisadores.

Alguns princípios básicos de catálise são utilizados por muitas enzimas

No Capítulo 8, vimos que a catálise enzimática começa com a ligação ao substrato. A energia de ligação é a energia livre liberada na formação de um grande número de interações fracas entre a enzima e o substrato. Podemos imaginar que essa energia de ligação atua servindo dois propósitos: ela estabelece a especificidade do substrato e aumenta a eficiência catalítica. Somente o substrato correto pode participar na maioria ou em todas as interações com a enzima e, portanto, maximizar a energia de ligação, respondendo pela notável especificidade pelo substrato exibida por muitas enzimas. Além disso, o conjunto total dessas interações só é formado quando a combinação da enzima com o substrato está no estado de transição. Por conseguinte, as interações entre a enzima e o substrato estabilizam o estado de transição, diminuindo, assim, a energia livre de ativação. A energia de ligação também pode promover alterações estruturais tanto na enzima quanto no substrato, facilitando a catálise, em um processo denominado *encaixe induzido*.

As enzimas comumente utilizam uma ou mais das seguintes estratégias para catalisar reações específicas:

1. *Catálise covalente*. Na catálise covalente, o sítio ativo contém um grupo reativo, habitualmente um poderoso nucleófilo, que temporariamente se liga de modo covalente a uma parte do substrato durante o processo de catálise. A quimiotripsina, uma enzima proteolítica, fornece um excelente exemplo dessa estratégia (Seção 9.1).

2. *Catálise ácido-base geral*. Na catálise ácido-base geral, uma molécula diferente da água desempenha o papel de doador ou aceptor de prótons. A quimiotripsina utiliza um resíduo de histidina como catalisador de base para aumentar o poder nucleofílico da serina (Seção 9.1), enquanto um resíduo de histidina na anidrase carbônica facilita a remoção de um íon hidrogênio de uma molécula de água ligada a um zinco, produzindo um íon hidróxido (Seção 9.2). No caso das

miosinas, um grupo fosfato do substrato ATP atua como base para promover a sua própria hidrólise (Seção 9.3).

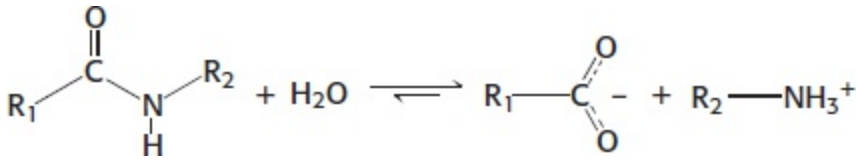
3. *Catálise por aproximação*. Muitas reações incluem dois substratos distintos, incluindo todas as quatro classes de hidrolases consideradas detalhadamente neste capítulo. Nesses casos, a velocidade da reação pode ser consideravelmente aumentada por aproximar os dois substratos a uma única superfície de ligação em uma enzima. Por exemplo, a anidrase carbônica liga-se ao dióxido de carbono e à água em sítios adjacentes para facilitar a sua reação (Seção 9.2).

4. Catálise por íons metálicos. Os íons metálicos podem atuar cataliticamente de diversas maneiras. Por exemplo, um íon metálico pode facilitar a formação de nucleófilos, como o íon hidróxido, por coordenação direta. Um íon zinco (II) serve para esse propósito na catálise pela anidrase carbônica (Seção 9.2). De modo alternativo, um íon metálico pode atuar como eletrófilo, estabilizando uma carga negativa em um intermediário da reação. Um íon magnésio (II) desempenha esse papel na *Eco*RV (Seção 9.3). Por fim, um íon metálico pode atuar como ponte entre a enzima e o substrato, aumentando a energia de ligação e mantendo o substrato em uma conformação apropriada para catálise. Essa estratégia é usada pelas miosinas (Seção 9.4) e, na verdade, por quase todas as enzimas que utilizam o ATP como substrato.

9.1 As proteases facilitam uma reação fundamentalmente difícil

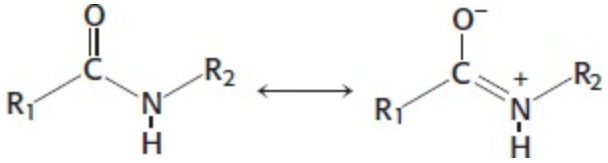
A renovação das proteínas constitui um importante processo nos sistemas vivos (Capítulo 23). As proteínas que já desempenharam a sua função devem ser degradadas, de modo que seus aminoácidos constituintes possam ser reciclados para a síntese de novas proteínas. As proteínas ingeridas precisam ser decompostas em peptídios pequenos e aminoácidos para a sua absorção intestinal. Além disso, conforme descrito detalhadamente no Capítulo 10, as reações proteolíticas são importantes na regulação da atividade de certas enzimas e outras proteínas.

As proteases clivam proteínas por uma reação de hidrólise – a adição de uma molécula de água a uma ligação peptídica:



Embora a hidrólise das ligações peptídicas seja termodinamicamente favorável, essas reações de hidrólise são extremamente lentas. Na ausência de um catalisador, a meia-vida para a hidrólise de um peptídico típico em pH neutro é estimada entre 10 e 1.000 anos. Contudo, as ligações peptídicas precisam ser hidrolisadas dentro de milissegundos em alguns processos bioquímicos.

A ligação química nas ligações peptídicas é responsável pela sua estabilidade cinética. Especificamente, a estrutura de ressonância que responde pela forma plana de uma ligação peptídica (Seção 2.2) também torna essas ligações resistentes à hidrólise. Essa estrutura de ressonância confere à ligação peptídica a sua característica parcial de dupla ligação:



A ligação carbono-nitrogênio é fortalecida pela sua característica de dupla ligação. Além disso, o átomo de carbono carbonílico é menos eletrofílico e menos suscetível ao ataque nucleofílico do que os átomos de carbono carbonílicos em compostos mais reativos, como ésteres de carboxilato. Consequentemente, para promover a clivagem de uma ligação peptídica, uma enzima precisa facilitar o ataque nucleofílico a um grupo carbonila normalmente não reativo.

A quimiotripsina possui um resíduo de serina altamente reativo

Várias enzimas proteolíticas participam na degradação das proteínas dos sistemas digestivos de mamíferos e de outros organismos. Uma dessas enzimas, a quimiotripsina, cliva ligações peptídicas de modo seletivo no lado carboxiterminal dos grandes aminoácidos hidrofóbicos, como o triptofano, a tirosina, a fenilalanina e a metionina (Figura 9.1). A quimiotripsina fornece um bom exemplo do uso da *catálise covalente*. A enzima emprega um poderoso nucleófilo para atacar o átomo de carbono carbonílico não reativo do substrato. Esse nucleófilo é fixado brevemente de modo covalente ao substrato durante a catálise.

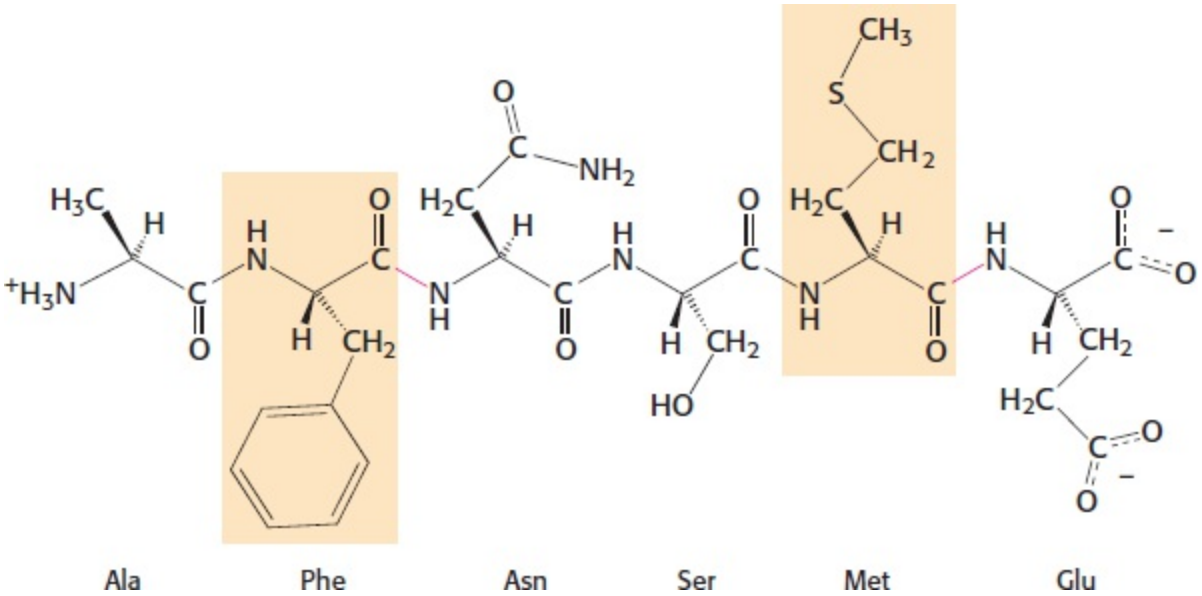


Figura 9.1 Especificidade da quimiotripsina. A quimiotripsina cliva proteínas no lado carboxílico de aminoácidos aromáticos ou hidrofóbicos grandes (em laranja). As prováveis ligações clivadas pela quimiotripsina estão indicadas em vermelho.

Qual é o nucleófilo empregado pela quimiotripsina para atacar o átomo de carbono carbonílico do substrato? Há um indício no fato de que a quimiotripsina contém um resíduo de serina extraordinariamente reativo. Moléculas de quimiotripsina tratadas com organofluorofosfatos, como o di-isopropilfosfofluoridato (DIPF), perdem irreversivelmente toda a atividade (Figura 9.2). Apenas um único resíduo, a serina 195, foi modificado. Essa reação de *modificação química* sugeriu que esse resíduo de serina inusitadamente reativo desempenha um papel central no mecanismo catalítico da quimiotripsina.

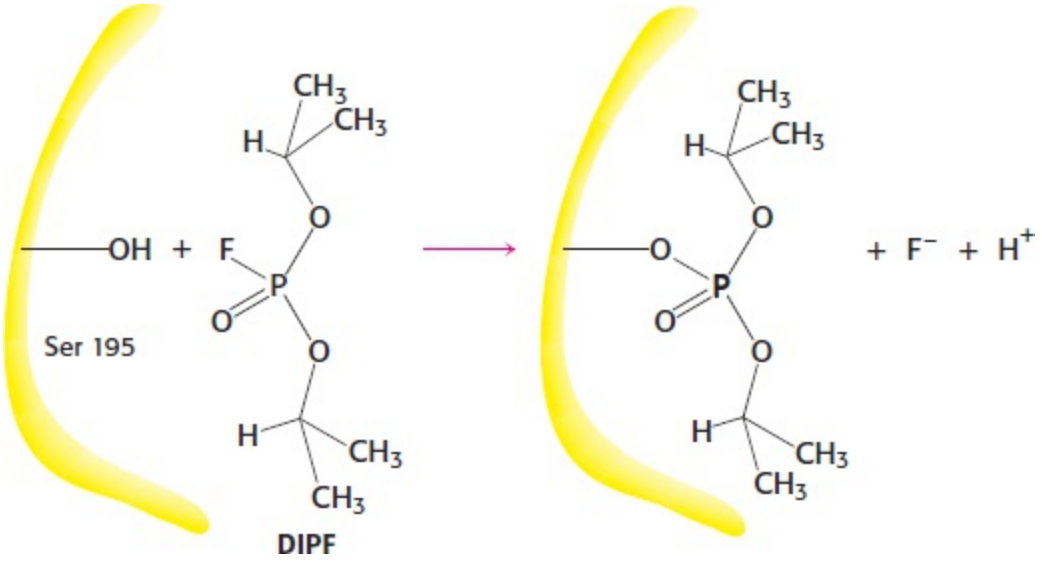


Figura 9.2 Um resíduo de serina inusitadamente reativo na quimiotripsina. A quimiotripsina é inativada mediante o tratamento com di-isopropilfosfofluoridato (DIPF), que reage apenas com a serina 195 entre 28 possíveis resíduos de serina.

A ação da quimiotripsina ocorre em duas etapas unidas por um intermediário ligado covalentemente

Um estudo da cinética da enzima forneceu uma segunda pista para o mecanismo de catálise da quimiotripsina. A cinética de ação de uma enzima é, com frequência, facilmente monitorada, deixando a enzima atuar sobre um análogo do substrato que forma um produto colorido. Para a quimiotripsina, esse *substrato cromogênico* é o éster de *N*-acetil-*L*-fenilalanina-*p*-nitrofenil. Esse substrato é um éster, e não uma amida; todavia, muitas proteases também hidrolisam ésteres. Um dos produtos formados pela clivagem desse substrato pela quimiotripsina é o *p*-nitrofenolato, que apresenta uma cor amarela (Figura 9.3). A medição da absorbância da luz revelou a quantidade de *p*-nitrofenolato produzida.

Em condições de equilíbrio dinâmico, a clivagem desse substrato obedece à cinética de Michaelis-Menten, com um valor de K_M de 20 μM e k_{cat} de 77 s^{-1}. A fase inicial da reação foi examinada pelo uso do método de fluxo interrompido, que possibilita a mistura da enzima com o substrato e o monitoramento dos resultados dentro de um milissegundo. Esse método revelou um surto inicial rápido do produto colorido, seguido de sua formação mais lenta à medida que a reação alcançou o estado de equilíbrio dinâmico (Figura 9.4). Esses resultados sugerem que a hidrólise ocorre em duas fases. No primeiro ciclo de reação, que ocorre imediatamente após a mistura, apenas a primeira fase deve ocorrer antes da liberação do produto colorido. Nos ciclos subsequentes de reação, ambas as fases devem ocorrer. Observe que o surto é detectado porque a primeira fase é substancialmente mais rápida do que a segunda para esse substrato.

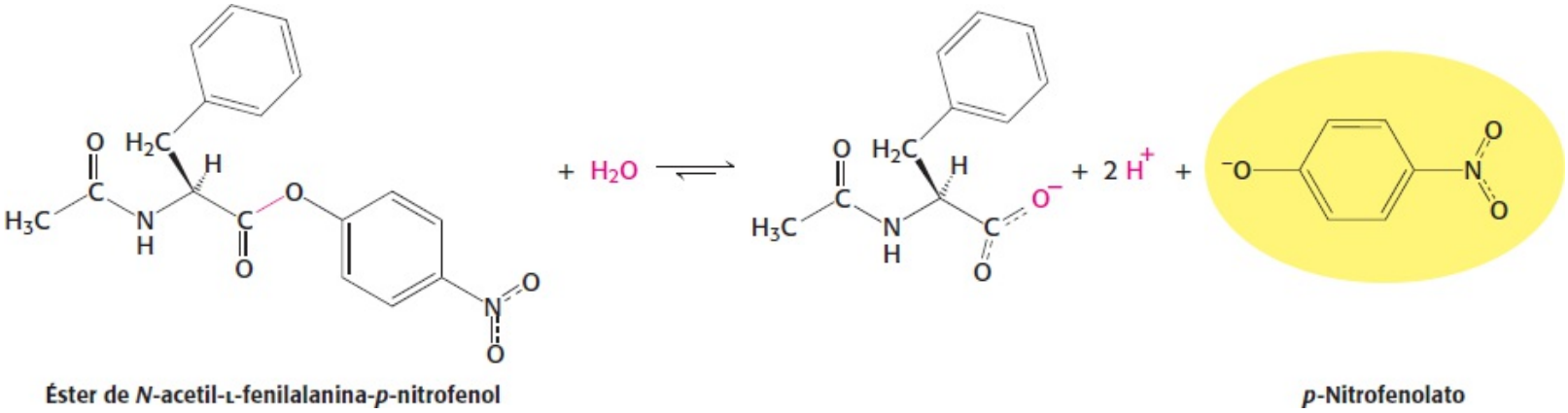


Figura 9.3 Substrato cromogênico. O éster de *N*-acetil-*L*-fenilalanina-*p*-nitrofenol gera um produto amarelo, o *p*-nitrofenolato, ao ser clivado pela quimiotripsina. O *p*-nitrofenolato é formado por desprotonação do *p*-nitrofenol em pH 7.

As duas fases são explicadas pela formação de um intermediário enzima-substrato ligado de modo covalente (Figura 9.5). Em primeiro lugar, o grupo acila do substrato liga-se de modo covalente à enzima, enquanto o *p*-nitrofenolato (ou uma amina, se o substrato for uma amida, em lugar de um éster) é liberado. O complexo enzima-grupo acila é denominado *intermediário acilenzima*. Em segundo lugar, o intermediário acil-enzima é hidrolisado, liberando o componente ácido carboxílico do substrato e regenerando a enzima livre. Por conseguinte, uma molécula de *p*-nitrofenolato é produzida rapidamente a partir de cada molécula de enzima, à medida que o intermediário acil-enzima é formado. Todavia, é necessário mais tempo para que a enzima seja "restabelecida" pela hidrólise do intermediário acil-enzima, e ambas as fases são necessárias para a renovação da enzima.

Figura 9.4 Cinética da catálise pela quimiotripsina. Duas fases são evidentes na clivagem do éster de *N*-acetil-*L*-fenilalanina *p*-nitrofenol pela quimiotripsina: uma fase de surto rápido (antes do estado de equilíbrio dinâmico) e uma fase de estado de equilíbrio dinâmico.

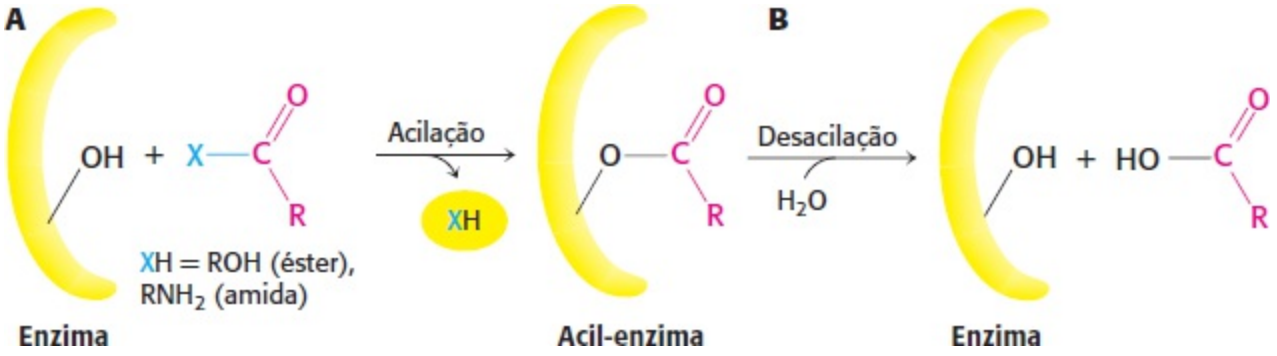


Figura 9.5 Catálise covalente. A hidrólise pela quimiotripsina ocorre em duas fases: acilação, formando o intermediário acil-enzima (**A**), seguida de desacilação para regenerar a enzima livre (**B**).

A serina faz parte de uma tríade catalítica que também inclui a histidina e o aspartato

A estrutura tridimensional da quimiotripsina foi determinada por David Blow em 1967. Em geral, a quimiotripsina é quase esférica e é constituída de três cadeias polipeptídicas, ligadas por pontes de dissulfeto. É sintetizada na forma de um único polipeptídio, denominado *quimiotripsinogênio*, que é ativado pela clivagem proteolítica do polipeptídio, produzindo três cadeias (Seção 10.4). O sítio ativo da quimiotripsina, marcado pela serina 195, situa-se em uma fenda na superfície da enzima (Figura 9.6). A estrutura do sítio ativo explica a reatividade especial da serina 195 (Figura 9.7). A cadeia lateral da serina 195 é ligada por pontes de hidrogênio ao anel imidazólico da histidina 57. O grupo — NH desse anel imidazólico é, por sua vez, ligado ao grupo carboxilato do aspartato 102 por pontes de hidrogênio. Essa constelação de resíduos é designada como *tríade catalítica*. Como esse arranjo de resíduos promove a alta reatividade da serina 195? O resíduo de histidina serve para posicionar a cadeia lateral da serina e para polarizar o seu grupo hidroxila, de modo que fique posicionado para desprotonação. Na presença do substrato, o resíduo de histidina aceita o próton do grupo hidroxila da serina 195. Ao fazê-lo, o resíduo atua como catalisador básico geral. A retirada do próton do grupo hidroxila gera um íon alcóxido, que é um nucleófilo muito mais poderoso do que um álcool. O resíduo de aspartato ajuda a orientar o resíduo de histidina e a torná-lo um melhor aceptor de prótons por meio de pontes de hidrogênio e efeitos eletrostáticos.

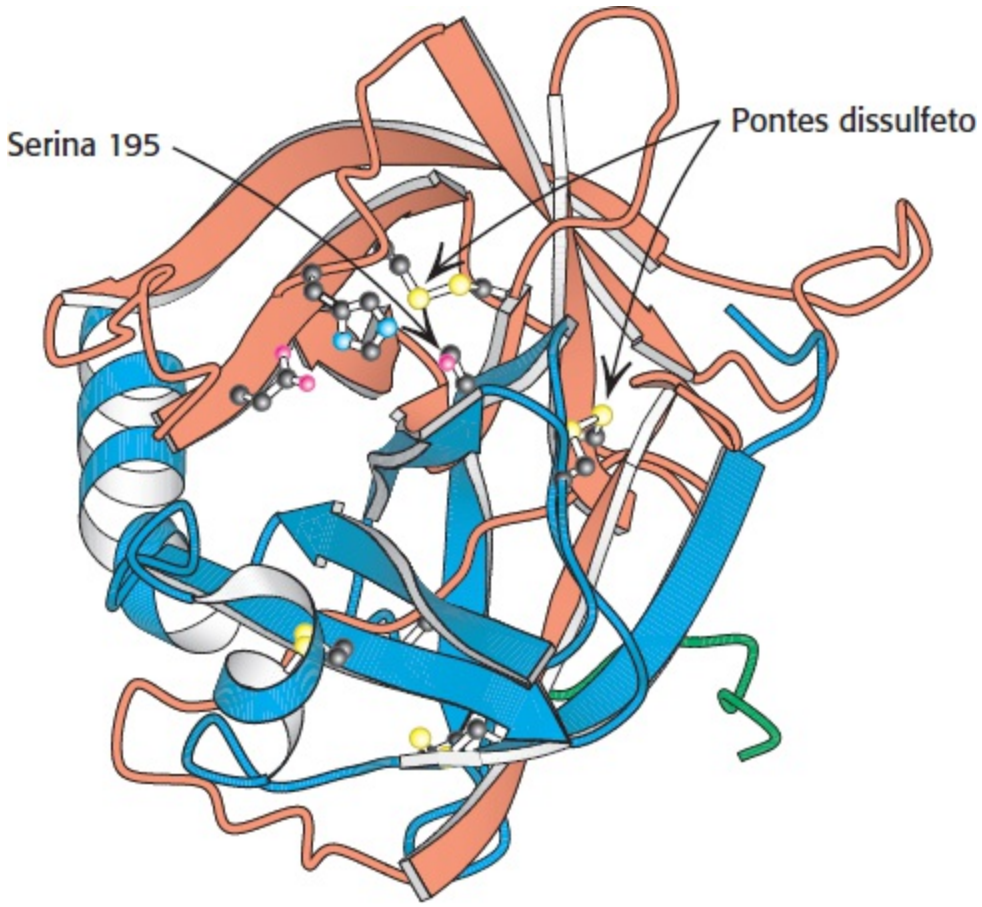


Figura 9.6 Localização do sítio ativo na quimiotripsina. A quimiotripsina é constituída de três cadeias, mostradas em formas de fita em laranja, azul e verde. As cadeias laterais dos resíduos da tríade catalítica são mostradas em representações de esferas e bastões. *Observe* essas cadeias laterais, incluindo a serina 195, revestindo o sítio ativo na

metade superior da estrutura. *Observe também* duas ligações dissulfeto dentro e entre as fitas em várias localizações por toda a molécula. [Desenhada a partir de 1GCT.pdb.]

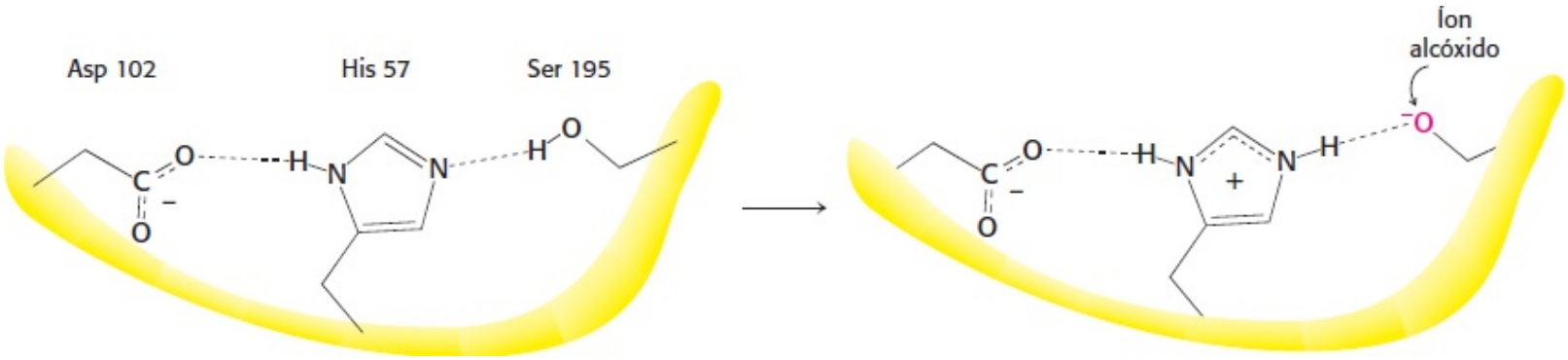


Figura 9.7 Tríade catalítica. A tríade catalítica, mostrada à esquerda, converte a serina 195 em um poderoso nucleófilo, conforme ilustrado à direita.

Essas observações sugerem um mecanismo para a hidrolise de peptídios (Figura 9.8). Após a ligação ao substrato (etapa 1), a reação começa com o átomo de oxigênio da cadeia lateral da serina 195 fazendo um ataque nucleofílico ao átomo de carbono cabonílico da ligação peptídica-alvo (etapa 2). Nessa etapa, existem quatro átomos ligados ao carbono carbonílico, dispostos em tetraedro, em lugar de três átomos em arranjo planar. Esse *intermediário tetraédrico* inerentemente instável apresenta uma carga negativa formal no átomo de oxigênio derivado do grupo carbonila. Essa carga é estabilizada por interações com grupos NH da proteína em um sítio denominado *cavidade de oxiânion* (Figura 9.9). Essas interações também ajudam a estabilizar o estado de transição que precede a formação do intermediário tetraédrico, o qual colapsa, originando o complexo acil-enzima (etapa 3). Essa etapa é facilitada pela transferência do próton mantido pelo resíduo de histidina de carga positiva para o grupo amino formado pela clivagem da ligação peptídica. O componente amina está agora livre para sair da enzima (etapa 4), completando o primeiro estágio da reação de hidrólise – a acilação da enzima.

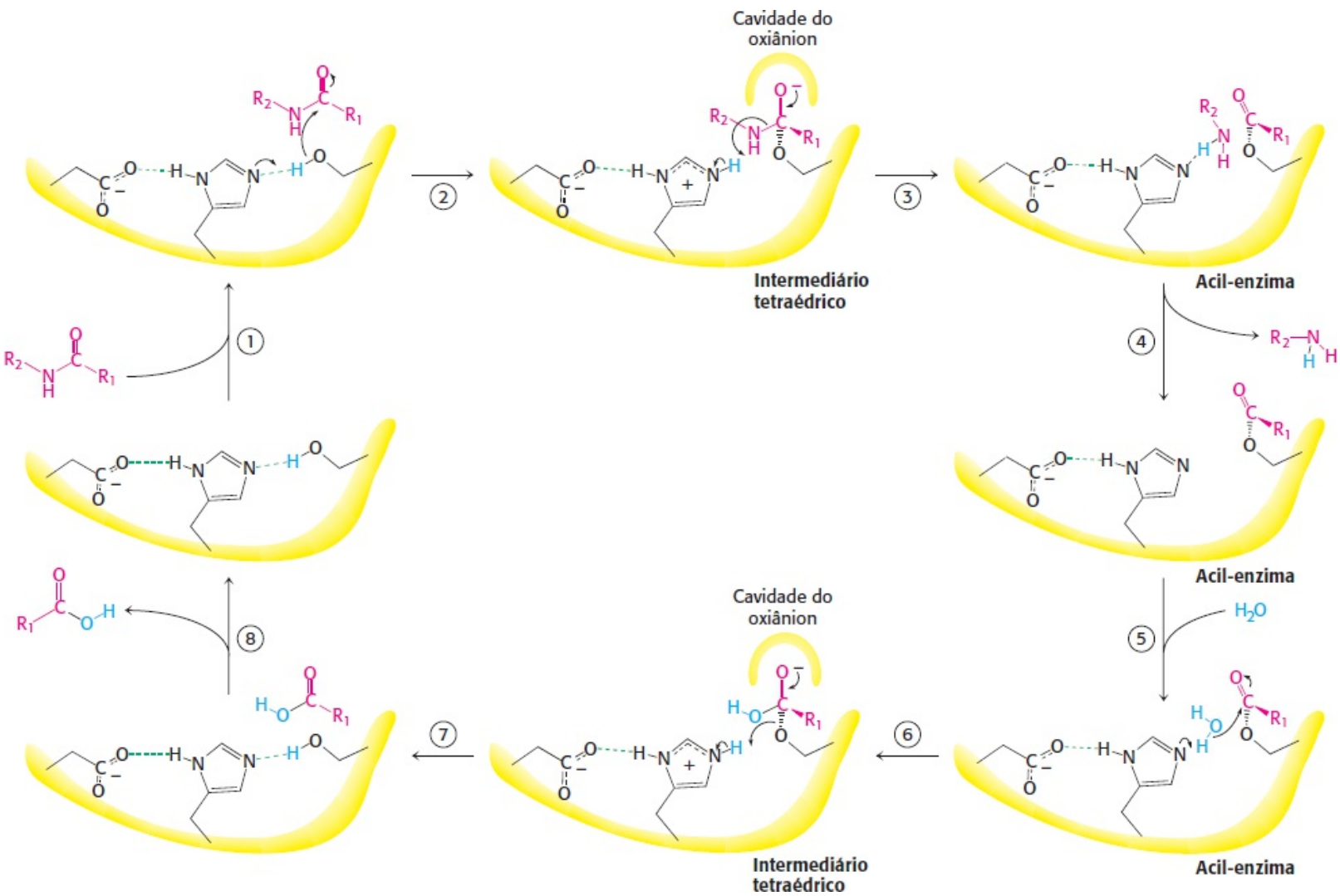


Figura 9.8 Hidrólise de peptídio pela quimiotripsina. O mecanismo de hidrólise de peptídio ilustra os princípios da catálise covalente e da catálise ácido-base. A reação ocorre em oito etapas: **1.** ligação do substrato; **2.** ataque nucleofílico da serina no grupo carbonila do peptídio; **3.** colapso do intermediário tetraédrico; **4.** liberação do componente amina; **5.** ligação da água; **6.** ataque nucleofílico da água ao intermediário acil-enzima; **7**. colapso do intermediário tetraédrico; e **8**. liberação do componente ácido carboxílico. As linhas verdes tracejadas representam pontes de hidrogênio.

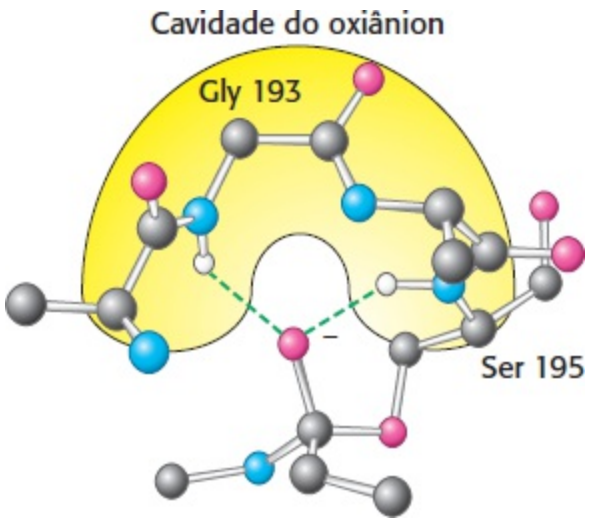


Figura 9.9 Cavidade de oxiânion. A estrutura estabiliza o intermediário tetraédrico da reação da quimiotripsina. Observe que as pontes de hidrogênio (mostradas em verde) ligam grupos NH peptídicos com o átomo de oxigênio de carga negativa do intermediário.

O estágio seguinte – a desacilação – começa quando uma molécula de água assume o lugar

ocupado anteriormente pelo componente amínico do substrato (etapa 5). O grupo éster da acil-enzima é então hidrolisado por um processo que repete essencialmente as etapas 2 a 4. A histidina 57, atuando, nesse estágio, como um catalisador ácido geral, retira um próton da molécula de água. O íon OH^- resultante ataca o átomo de carbono carbonílico do grupo acila, formando um intermediário tetraédrico (etapa 6). Essa estrutura se decompõe, formando, como produto, o ácido carboxílico (etapa 7). Por fim, a liberação do produto ácido carboxílico (etapa 8) deixa a enzima pronta para outro ciclo de catálise.

Esse mecanismo responde por todas as características da ação da quimiotripsina, exceto a preferência observada pela clivagem das ligações peptídicas imediatamente após resíduos com grandes cadeias laterais hidrofóbicas. O exame da estrutura tridimensional da quimiotripsina com análogos de substrato e inibidores enzimáticos revelou a presença de uma bolsa hidrofóbica profunda, denominada bolsa S_1, na qual pode se encaixar às longas cadeias laterais sem carga de resíduos, como a fenilalanina e o triptofano. *A ligação de uma cadeia lateral apropriada nessa bolsa posiciona a ligação peptídica adjacente no sítio ativo para clivagem* (Figura 9.10). A especificidade da quimiotripsina depende quase totalmente do aminoácido que está diretamente no lado aminoterminal da ligação peptídica a ser clivada. Outras proteases exibem padrões mais complexos de especificidade. Essas enzimas apresentam bolsas adicionais em sua superfície para o reconhecimento de outros resíduos no substrato. Os resíduos no lado aminoterminal da ligação passível de cisão (a ligação a ser clivada) são denominados P_1, P_2, P_3, e assim por diante, a partir da ligação passível de cisão (Figura 9.11). De modo semelhante, os resíduos no lado carboxílico da ligação passível de cisão são denominados P_1', P_2', P_3', e assim por diante. Os sítios correspondentes na enzima são designados como S_1, S_2 ou S_1', S_2', e assim por diante.

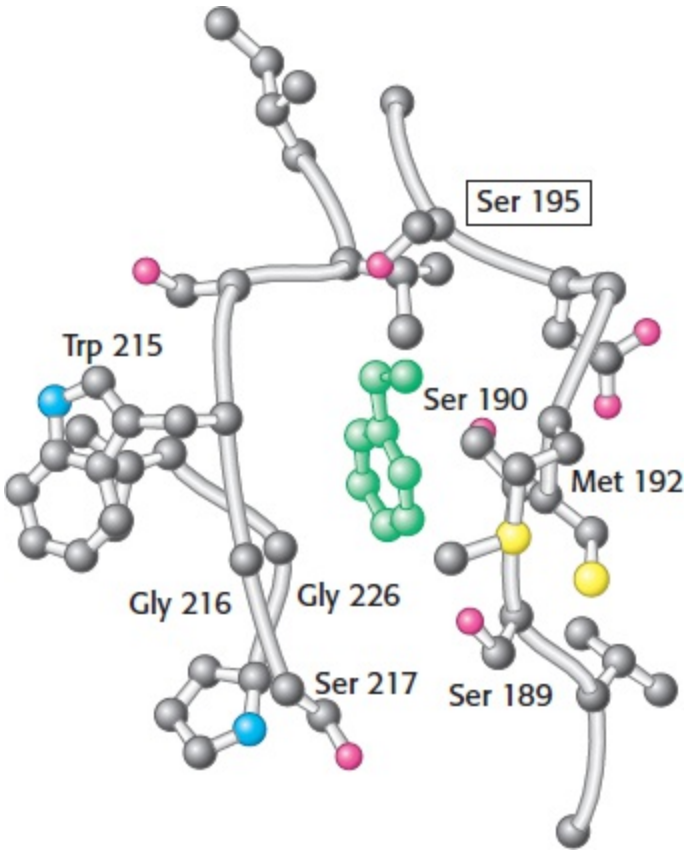


Figura 9.10 Bolsa de especificidade da quimiotripsina. *Observe* que essa bolsa é revestida por resíduos hidrofóbicos e é profunda, favorecendo a ligação de resíduos com longas cadeias laterais hidrofóbicas, como a fenilalanina (mostrada em verde). *Observe também* que o resíduo de serina do sítio ativo (serina 195) está posicionado para clivar o arcabouço

peptídico entre o resíduo ligado na bolsa e o próximo resíduo na sequência. Os aminoácidos essenciais que constituem o sítio de ligação estão identificados.

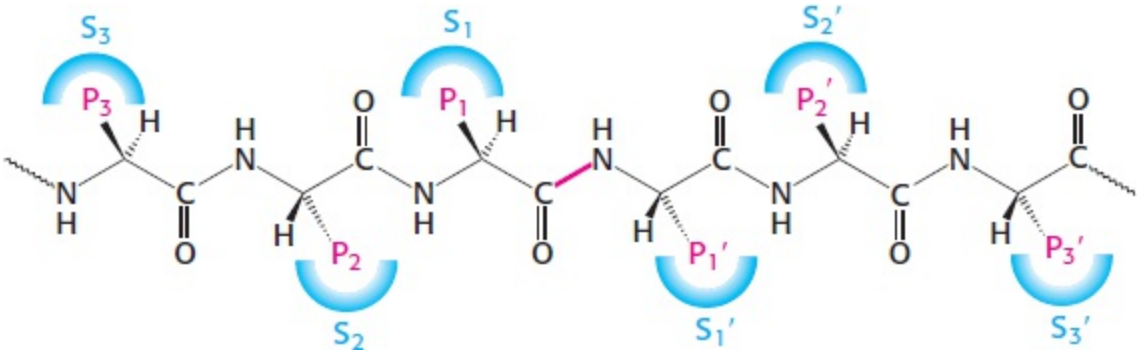


Figura 9.11 Nomenclatura de especificidade para interações protease-substrato. Os sítios potenciais de interação do substrato com a enzima são designados como P (mostrados em vermelho), enquanto os sítios de ligação correspondentes na enzima são chamados de S. A ligação passível de cisão (também mostrada em vermelho) é o ponto de referência.

Tríades catalíticas são encontradas em outras enzimas hidrolíticas

Foram identificadas muitas outras proteínas que clivam peptídios, e contêm tríades catalíticas semelhantes àquelas descobertas na quimiotripsina. Algumas, como a tripsina e a elastase, são homólogas óbvias da quimiotripsina. As sequências dessas proteínas têm aproximadamente 40% de identidade com a da quimiotripsina, e suas estruturas globais são muito semelhantes (Figura 9.12). Essas proteínas operam por mecanismos idênticos aos da quimiotripsina. Todavia, as três enzimas diferem acentuadamente na sua especificidade de substrato. A quimiotripsina cliva a ligação peptídica depois de resíduos com uma cadeia lateral aromática ou apolar longa. A tripsina cliva a ligação peptídica após resíduos com longas cadeias laterais de carga positiva – isto é, arginina e lisina. A elastase cliva a ligação peptídica após aminoácidos com pequenas cadeias laterais – como a alanina e a serina. A comparação das bolsas S_1 dessas enzimas revela que *essas três especificidades diferentes são devidas a pequenas diferenças estruturais*. Na tripsina, existe um resíduo de aspartato (Asp 189) na base da bolsa S_1 em lugar de um resíduo de serina na quimiotripsina. O resíduo de aspartato atrai e estabiliza um resíduo de arginina ou lisina de carga positiva no substrato. Na elastase, dois resíduos na parte superior da bolsa da quimiotripsina e da tripsina são substituídos por resíduos muito mais volumosos de valina (Val 190 e Val 216). Esses resíduos obliteram a boca da bolsa, de modo que possam entrar apenas pequenas cadeias laterais (Figura 9.13).

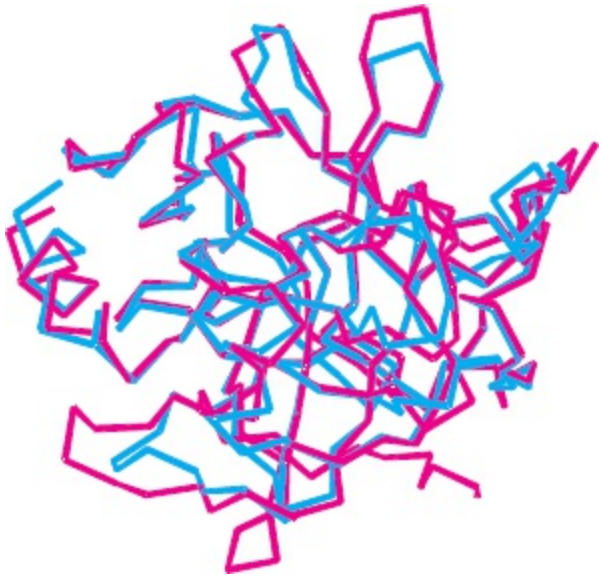


Figura 9.12 Semelhança estrutural da tripsina com a quimiotripsina. A figura mostra uma sobreposição da estrutura da quimiotripsina (em vermelho) com a da tripsina (em azul). *Observe* o alto grau de semelhança. São mostradas apenas as posições dos átomos de carbono α. O desvio médio de posição entre átomos de carbono α correspondentes é de 1.7 Å. [Desenhada a partir de 5PTP.pdb e 1GCT.pdb.]

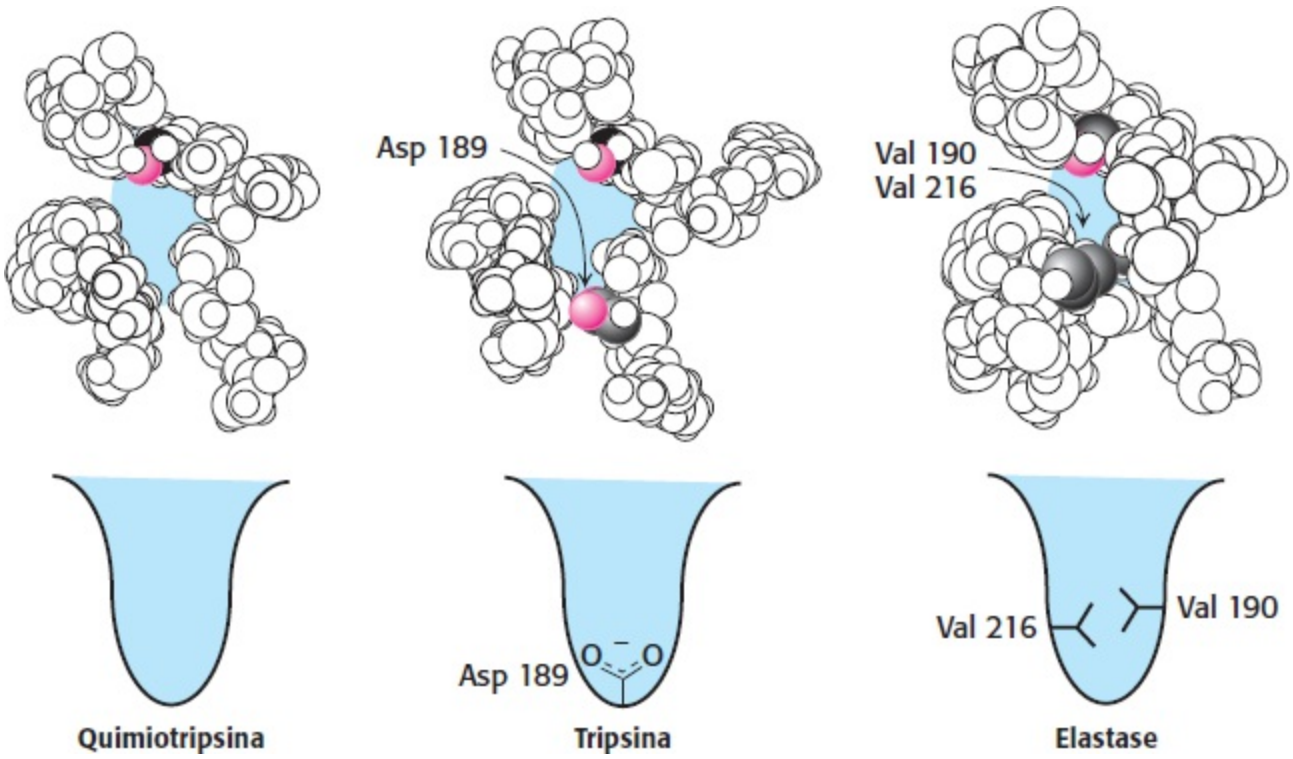


Figura 9.13 As bolsas S_1 da quimiotripsina, tripsina e elastase. Certos resíduos desempenham papeis essenciais na determinação da especificidade dessas enzimas. As cadeias laterais desses resíduos, bem como as dos resíduos de serina do sítio ativo, são mostradas em cores.

Outros membros da família da quimiotripsina incluem uma coleção de proteínas que atuam na coagulação do sangue, discutida no Capítulo 10, bem como o antígeno prostático específico (PSA, do inglês *prostate-specific antigen*), uma proteína que serve de marcador tumoral. Além disso, uma ampla variedade de proteases encontradas em bactérias, vírus e plantas também pertence a esse clã.

Foram encontradas outras enzimas que não são homólogas à quimiotripsina, mas que contêm sítios ativos muito semelhantes. Conforme assinalado no Capítulo 6, a presença de sítios ativos muito semelhantes nessas diferentes famílias de proteínas representa uma consequência da evolução

convergente. A subtilisina, uma protease encontrada em bactérias como *Bacillus amyloliquefaciens*, é um bom exemplo. O sítio ativo dessa enzima inclui tanto a tríade catalítica quanto a cavidade do oxiânion. Entretanto, um dos grupos NH que forma a cavidade do oxiânion provém da cadeia lateral de um resíduo de asparagina, e não do arcabouço peptídico (Figura 9.14). A subtilisina é o membro fundador de outra grande família de proteases, que inclui representantes de *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*.

Por fim, foram descobertas outras proteases que contêm um resíduo de serina ou treonina no sítio ativo, que é ativado não por um par de histidina-aspartato, mas por um grupo amino primário da cadeia lateral da lisina ou pelo grupo amino N-terminal da cadeia polipeptídica.

Por conseguinte, a tríade catalítica nas proteases emergiu pelo menos três vezes durante a evolução. Podemos concluir que essa estratégia catalítica deve ser uma abordagem particularmente efetiva para a hidrólise de peptídios e ligações relacionadas.

A tríade catalítica foi dissecada por mutagênese sítio-dirigida

Como podemos ter certeza de que o mecanismo proposto para a tríade catalítica é correto? Uma maneira de testar a contribuição dos resíduos individuais de aminoácido para o poder de catálise de uma protease consiste em utilizar a mutagênese sítio-dirigida (Seção 5.2). A subtilisina foi extensamente estudada por esse método. Cada um dos resíduos dentro da tríade catalítica, que consiste em ácido aspártico 32, histidina 64 e serina 221, foi individualmente convertido em alanina, e foi examinada a capacidade de cada enzima mutante de clivar um substrato modelo (Figura 9.15).

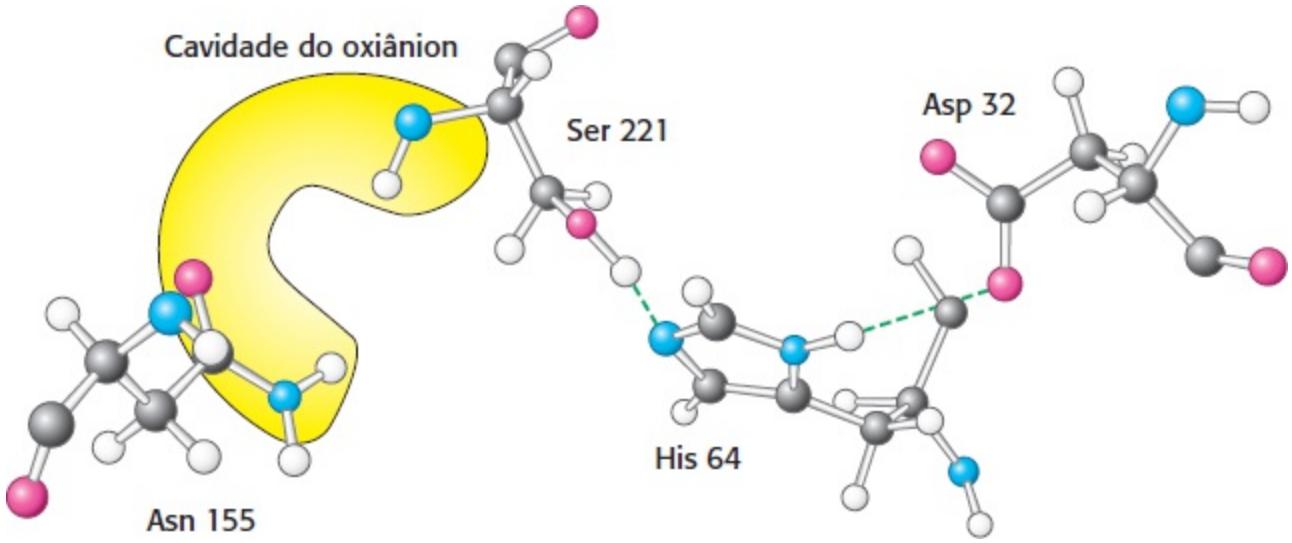


Figura 9.14 A tríade catalítica e a cavidade de oxiânion da subtilisina. *Observe* os dois grupos NH da enzima (tanto no arcabouço quanto na cadeia lateral da Asn 155) localizados na cavidade do oxiânion. Os grupos NH estabilizam uma carga negativa que se desenvolve na ligação peptídica atacada pela serina 221 nucleofílica da tríade catalítica.

Conforme esperado, a conversão da serina 221 do sítio ativo em alanina reduziu drasticamente o poder de catálise; o valor de k_{cat} caiu para menos de *um milionésimo* de seu valor para a enzima do tipo selvagem. O valor de K_M permaneceu essencialmente inalterado; seu aumento, que não ultrapassou um fator de dois, indicou que o substrato continuava se ligando normalmente. A mutação da histidina 64 para a alanina reduziu o poder catalítico para um grau semelhante. A conversão do aspartato 32 em alanina reduziu menos o poder de catálise, embora o valor de k_{cat} também tenha

caído para menos de 0,005% de seu valor no tipo selvagem. A conversão simultânea de todos os três resíduos em alanina não foi mais deletéria do que a conversão da serina ou histidina apenas. Essas observações sustentam a noção de que a tríade catalítica e, em particular, o par serina-histidina atuam em conjunto para produzir um nucleófilo com poder suficiente para atacar o átomo de carbono carbonílico de uma ligação peptídica. Apesar da redução de seu poder de catálise, as enzimas mutantes ainda hidrolisam peptídios 1.000 vezes mais rapidamente do que um tampão em pH 8,6.

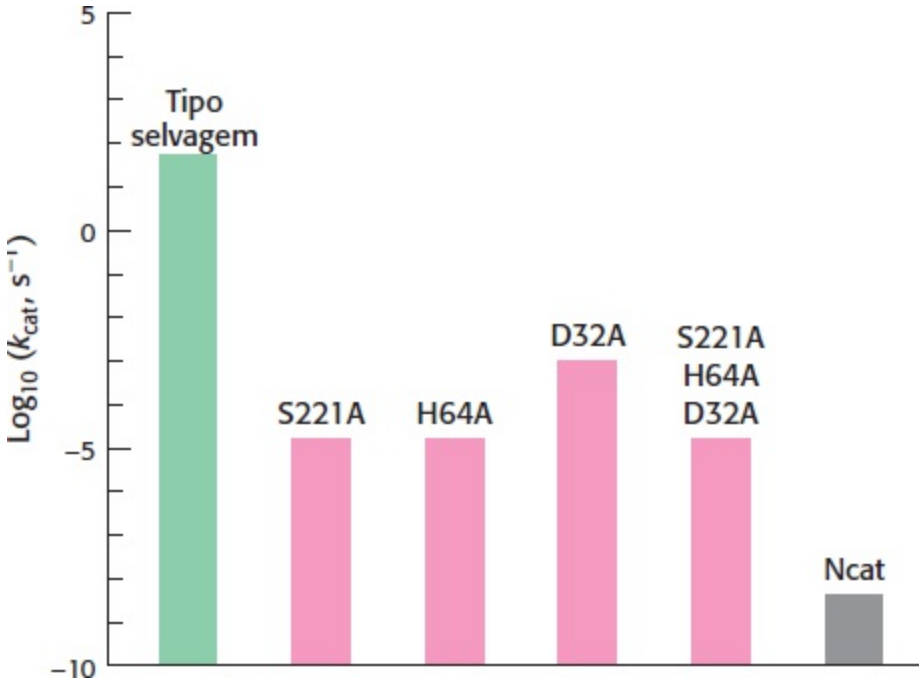


Figura 9.15 Mutagênese sítio-dirigida da subtilisina. Os resíduos da tríade catalítica foram mutados para a alanina, e foi determinada a atividade da enzima mutante. As mutações em qualquer componente da tríade catalítica provocam uma perda drástica da atividade enzimática. Observe que a atividade é apresentada em uma escala logarítmica. As mutações são identificadas da seguinte maneira: a primeira letra é a abreviatura de uma letra do aminoácido que está sendo alterado; o número identifica a posição do resíduo na estrutura primária; e a segunda letra é a abreviatura de uma letra do aminoácido que substitui o original. Ncat refere-se à velocidade estimada da reação não catalisada.

A mutagênese sítio-dirigida também forneceu um meio de sondar a importância da cavidade do oxiânion para a catálise. A mutação da asparigina 155 em glicina eliminou o grupo NH da cadeia lateral da cavidade do oxiânion da subtilisina. A eliminação do grupo NH reduziu o valor de k_{cat} para 0,2% do seu valor no tipo selvagem, porém aumentou o valor de K_M por apenas um fator de dois. Essas observações demonstram que o grupo NH do resíduo de asparigina desempenha um papel significativo na estabilização do intermediário tetraédrico e no estado de transição que leva a ele.

As cisteína, aspartil e metaloproteases constituem outras classes importantes de enzimas de clivagem de peptídios

Nem todas as proteases utilizam estratégias baseadas em resíduos de serina ativados. Foram descobertas classes de proteínas que empregam três abordagens alternativas para a hidrólise de ligações peptídicas (Figura 9.16). Essas classes são: (1) as cisteína proteases, (2) as aspartil proteases e (3) as metaloproteases. Em cada caso, a estratégia consiste em produzir um nucleófilo que ataca o grupo carbonila do peptídio (Figura 9.17).

A estratégia utilizada pelas *cisteína proteases* é muito semelhante àquela empregada pela família

da quimiotripsina. Nessas enzimas, um resíduo de cisteína, ativado por um resíduo de histidina, desempenha o papel de nucleófilo que ataca a ligação peptídica (Figura 9.17) de modo muito análogo ao do resíduo de serina nas serina proteases. Como o átomo de enxofre na cisteína é inerentemente um melhor nucleófilo do que o átomo de oxigênio na serina, as cisteína proteases parecem necessitar apenas desse resíduo de histidina além da cisteína, e não da tríade catalítica completa. Um exemplo bem estudado dessas proteínas é a papaína, uma enzima purificada do mamão. Foram descobertas proteases de mamíferos homólogas à papaína, mais notavelmente as catepsinas, proteínas que participam do sistema imune e de outros sistemas. O sítio ativo com base na cisteína surgiu independentemente pelo menos duas vezes durante a evolução; as caspases, isto é, enzimas que desempenham um papel importante na apoptose, apresentam sítios ativos semelhantes ao da papaína, porém suas estruturas globais não são aparentadas.

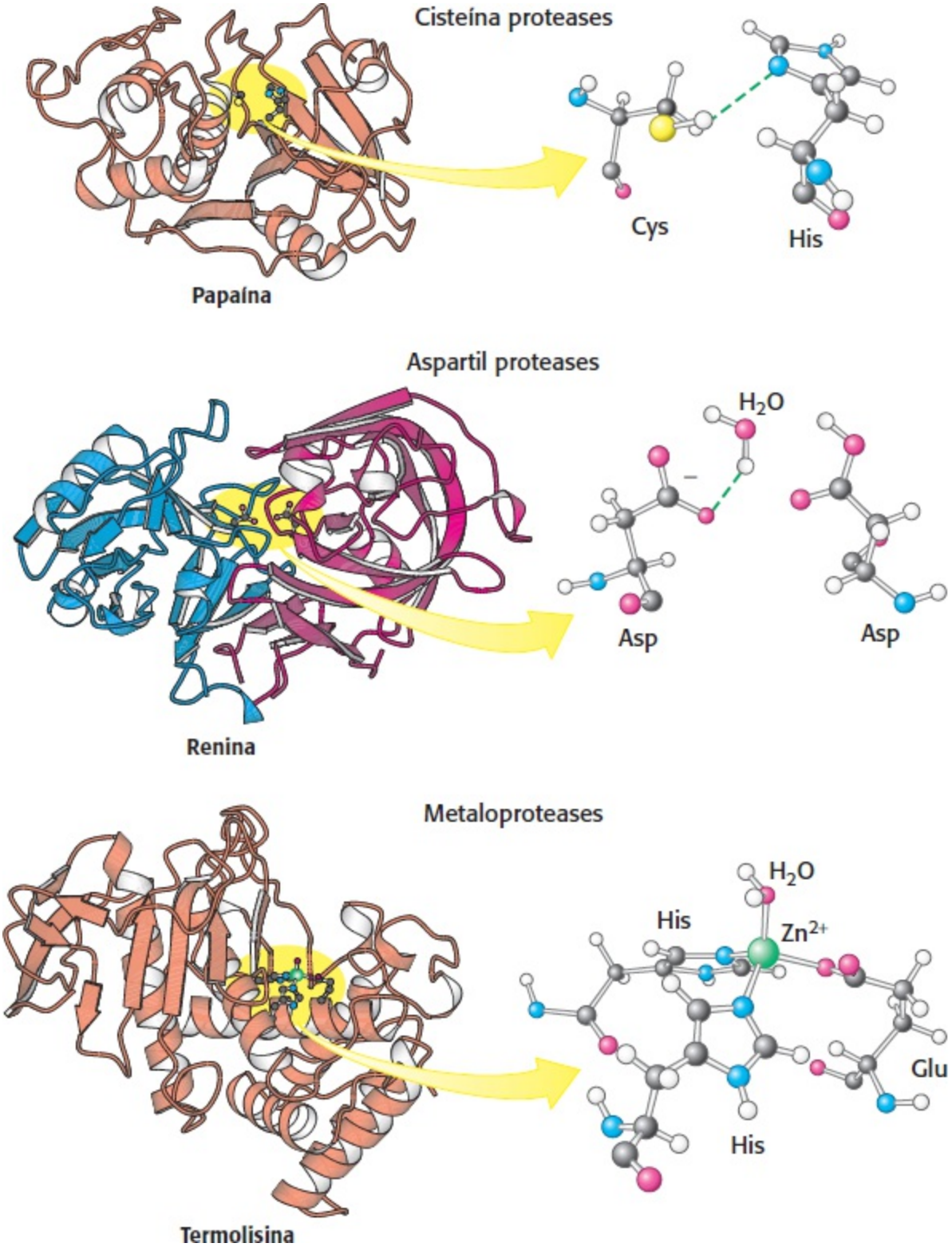


Figura 9.16 Três classes de protease e seus sítios ativos. Esses exemplos de uma cisteína protease, uma aspartil protease e uma metaloprotease que utilizam, respectivamente, um resíduo de cisteína ativado pela histidina, uma molécula de água ativada pelo aspartato e uma molécula de água ativada por metal como nucleófilo. As duas metades da renina estão em azul e vermelho para ressaltar a simetria bilateral aproximada das aspartil proteases. Observe como esses sítios ativos são diferentes, apesar da semelhança nas reações que catalisam. [Desenhada a partir de 1PPN.pdb.; 1HRN. pdb; 1LND.pdb.]

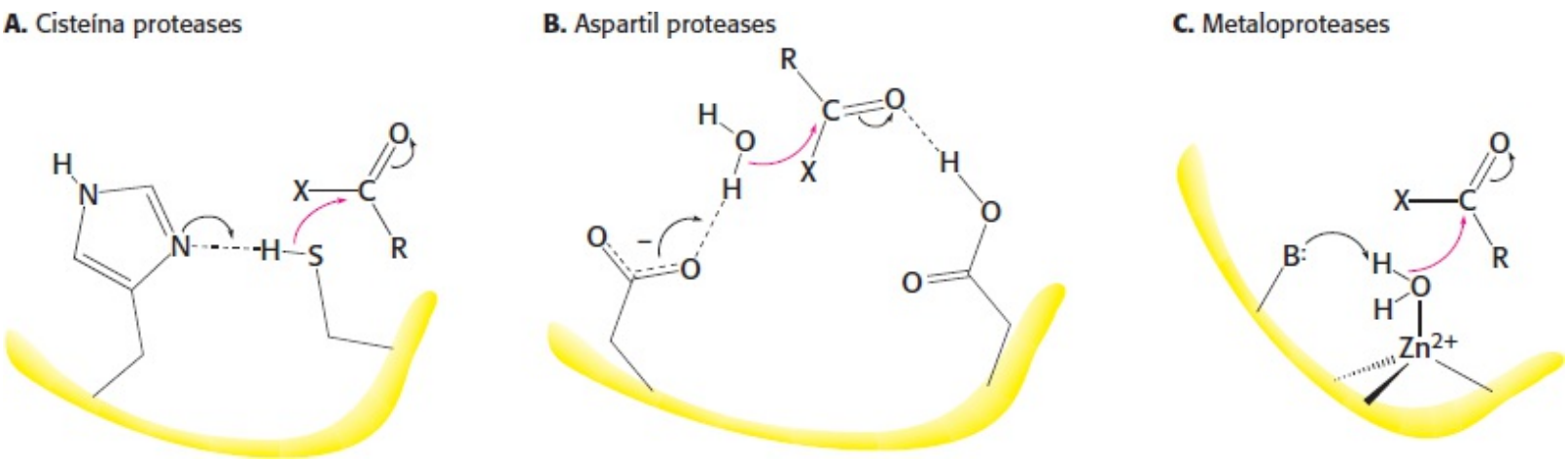


Figura 9.17 Estratégias de ativação das três classes de proteases. O grupo carbonila do peptídio é atacado por: **A.** uma cisteína ativada por histidina nas cisteína proteases; **B.** uma molécula de água ativada por aspartato nas aspartil proteases; e **C.** uma molécula de água ativada por metal nas metaloproteases. Para as metaloproteases, a letra B representa uma base (frequentemente glutamato) que ajuda a desprotonar a água ligada ao metal.

A segunda classe compreende as *aspartil proteases*. A característica fundamental dos sítios ativos consiste em um par de resíduos de ácido aspártico que atuam em conjunto, possibilitando o ataque da ligação peptídica por uma molécula de água. Um dos resíduos de ácido aspártico (em sua forma desprotonada) ativa a molécula de água do ataque posicionando-a para a desprotonação. O outro resíduo de ácido aspártico (em sua forma protonada) polariza o grupo carbonila do peptídio, de modo que seja mais suscetível ao ataque (Figura 9.17). Os membros dessa classe incluem a renina, uma enzima que participa da regulação da pressão arterial, e a enzima digestiva pepsina. Essas proteínas apresentam uma simetria bilateral aproximada. Um cenário provável é que duas cópias de um gene para a enzima ancestral se fundiram, formando um único gene que codificou uma enzima de cadeia simples. Cada cópia do gene teria contribuído com um resíduo de aspartato para o sítio ativo. As cadeias individuais estão agora unidas para formar uma cadeia única nas aspartil proteases encontradas no vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*) e em outros retrovírus (Figura 9.18). Essa observação é compatível com a ideia de que a enzima pode ter existido originalmente como subunidades separadas.

As metaloproteases constituem a última classe importante de enzimas de clivagem de peptídios. O sítio ativo de uma dessas proteínas contém um íon metálico ligado, quase sempre zinco, que ativa uma molécula de água para atuar como nucleófilo, para atacar o grupo carbonila do peptídio. A enzima bacteriana termolisina e a enzima digestiva carboxipeptidase A são exemplos clássicos das proteases dependentes de zinco. A termolisina, mas não a carboxipeptidase A, é um membro de uma grande família diversificada de proteases dependentes de zinco homólogas, que inclui as metaloproteases da matriz, enzimas que catalisam as reações no remodelamento e degradação dos tecidos.

Em cada uma dessas três classes de enzimas, o sítio ativo inclui características que atuam para (1) ativar uma molécula de água ou outro nucleófilo, (2) polarizar o grupo carbonila do peptídio e (3) estabilizar um intermediário tetraédrico (Figura 9.17).

Os inibidores das proteases são fármacos importantes

Vários fármacos importantes são inibidores das proteases. Por exemplo, o captopril, utilizado para

regular a pressão arterial, é um inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA), uma metaloprotease. O indinavir, o retrovir e mais de 20 outros compostos usados no tratamento da AIDS são inibidores da protease do HIV, que é uma aspartil protease. A protease do HIV cliva proteínas virais de múltiplos domínios, convertendo-as em suas formas ativas; o bloqueio desse processo impede por completo a infecciosidade do vírus (Figura 9.18). Os inibidores da protease do HIV, em associação aos inibidores de outras enzimas essenciais do HIV, reduziram drasticamente a taxa de mortalidade da AIDS em circunstâncias em que esses fármacos podem ser usados (ver Figura 36.21).

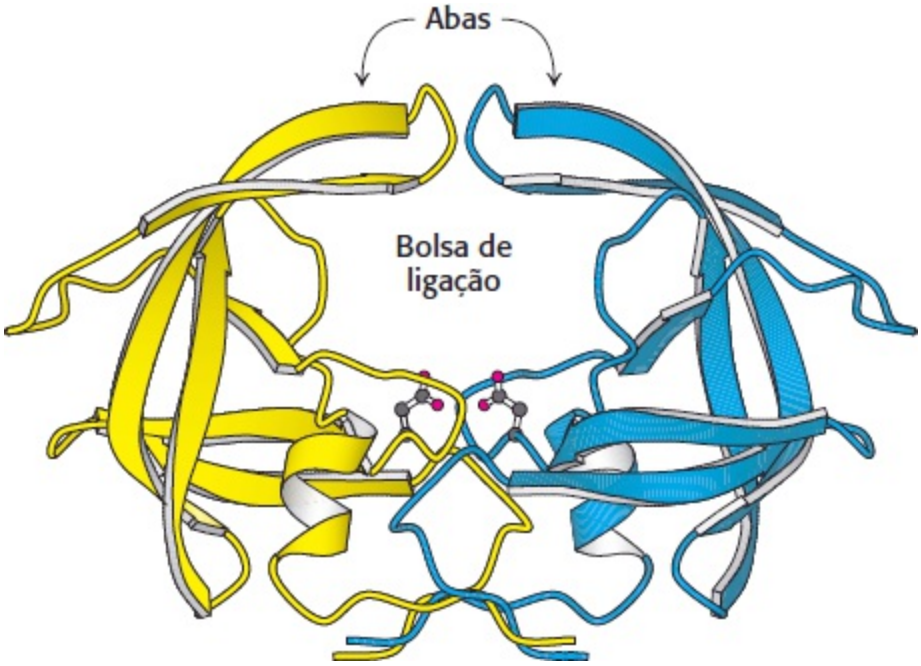


Figura 9.18 Protease do HIV, uma aspartil protease dimérica. A protease é um dímero de subunidades idênticas, mostradas em azul e amarelo, cada uma constituída de 99 aminoácidos. Observe a posição dos resíduos de ácido aspártico do sítio ativo, um de cada cadeia, que são mostrados como estruturas em esferas e bastões. As abas fecham-se sobre a bolsa de ligação após a ligação do substrato. [Desenhada a partir de 3PHV.pdb.]

O indinavir assemelha-se ao substrato peptídico da protease do HIV. Esse fármaco é construído em torno de um álcool que imita o intermediário tetraédrico; outros grupos estão presentes para se ligarem aos sítios de reconhecimento S_2, S_1, S_1' e S_2' da enzima (Figura 9.19). Estudos de cristalografia de raios X revelaram que, no sítio ativo, o indinavir adota uma conformação que se aproxima da simetria bilateral da enzima (Figura 9.20). O sítio ativo da protease do HIV é coberto por duas abas flexíveis, que se dobram na parte superior do inibidor ligado. O grupo OH do álcool central interage com os dois resíduos de aspartato do sítio ativo. Além disso, dois grupos carbonila do inibidor estão ligados a uma molécula de água (não mostrada na Figura 9.20) por pontes de hidrogênio; a água, por sua vez, forma pontes de hidrogênio com um grupo NH peptídico em cada uma das abas. Essa interação do inibidor com água e com a enzima não é possível com aspartil proteases celulares, como a renina. Por conseguinte, a interação pode contribuir para a especificidade do indinavir para a protease do HIV.

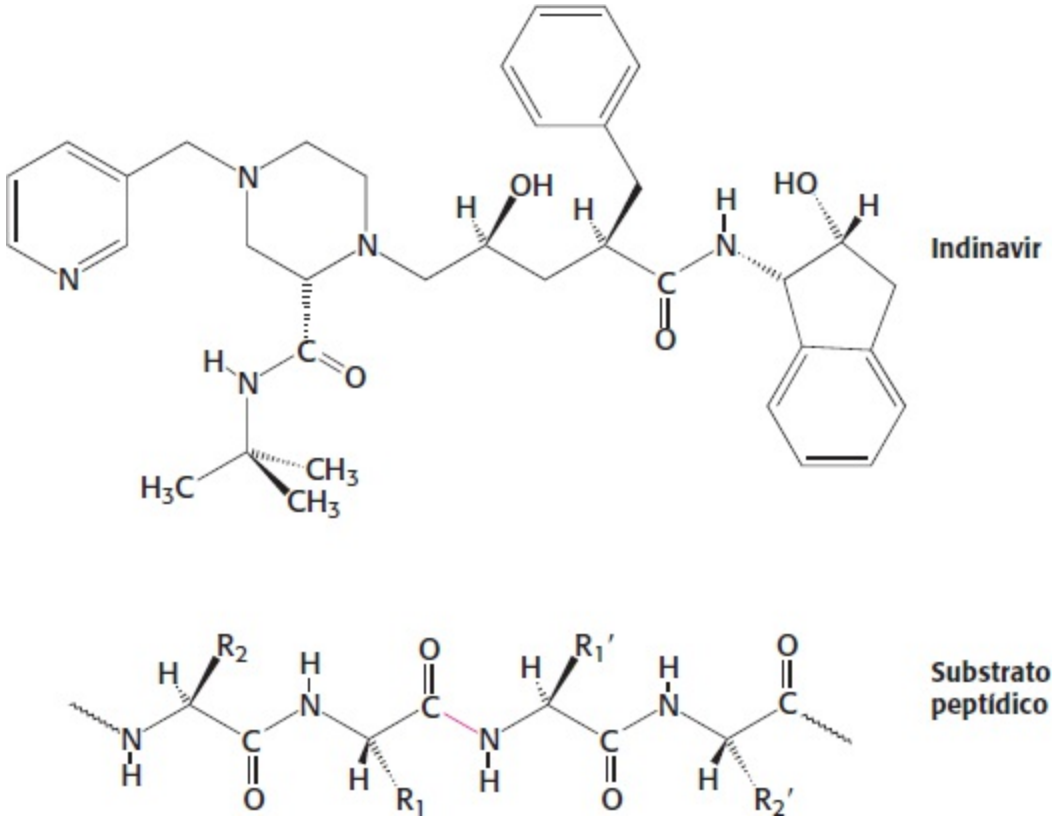


Figura 9.19 Indinavir, um inibidor da protease do HIV. A figura mostra a estrutura do indinavir em comparação com a de um substrato peptídico da protease do HIV. A ligação passível de cisão no substrato está destacada em vermelho.

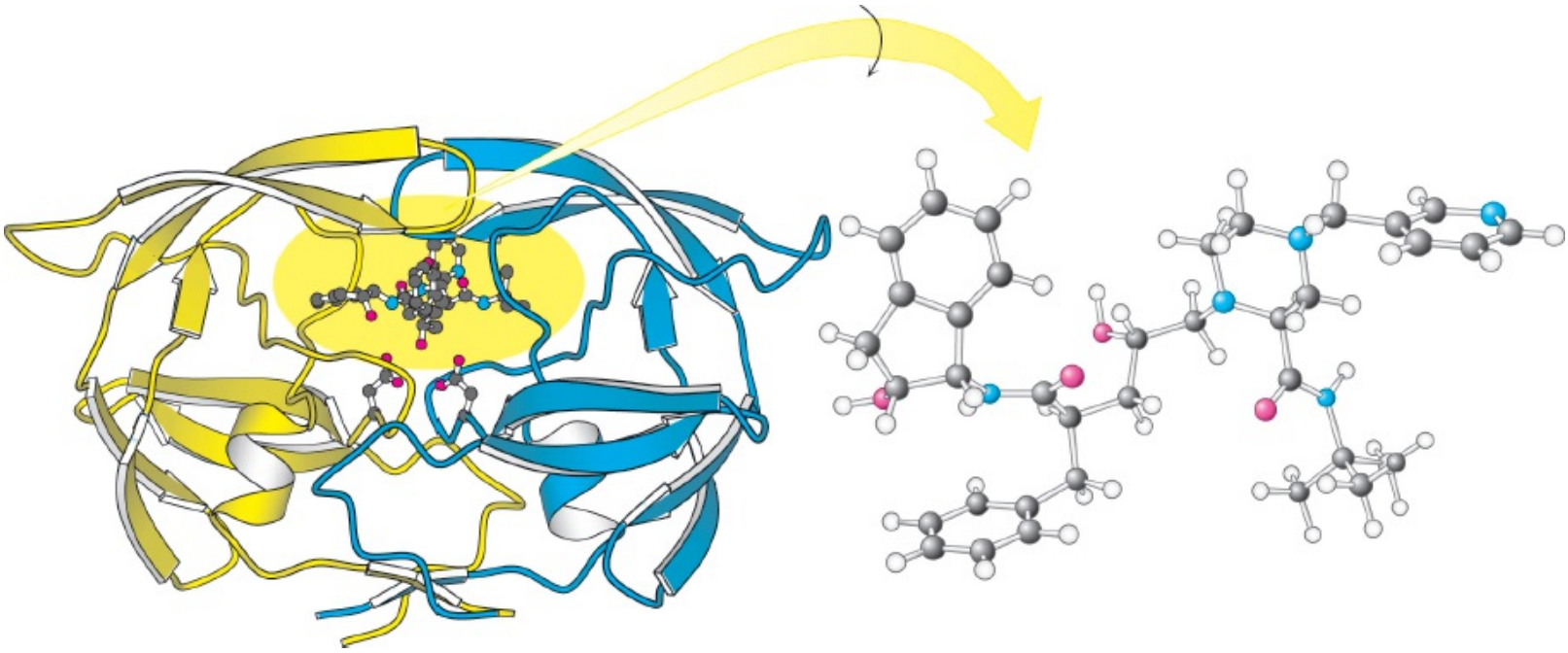
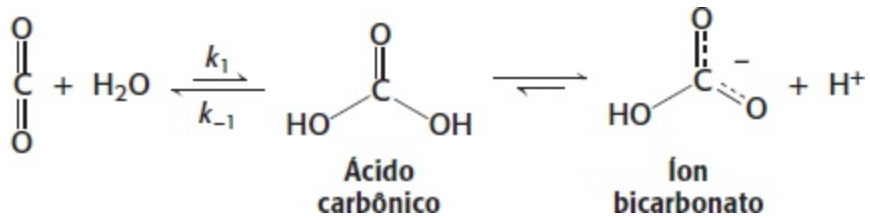


Figura 9.20 Complexo de protease do HIV-indinavir. (À esquerda) A protease do HIV é mostrada com o inibidor indinavir ligado ao sítio ativo. *Observe* a simetria bilateral da estrutura da enzima. (À direita) A rotação do fármaco possibilitou revelar a sua conformação simétrica bilateral aproximada. [Desenhada a partir de 1HSH.pdb.]

Os inibidores da protease usados como fármacos precisam ser específicos para determinada enzima, sem inibir outras proteínas do corpo, a fim de evitar a ocorrência de efeitos colaterais.

9.2 As anidrases carbônicas aceleram uma reação rápida

O dióxido de carbono é um importante produto final do metabolismo aeróbico. Nos mamíferos, esse dióxido de carbono é liberado no sangue e transportado até os pulmões para exalação. Nos eritrócitos, o dióxido de carbono reage com água (Seção 7.3). O produto dessa reação é um ácido moderadamente forte, o ácido carbônico (pK_a = 3,5), que é convertido em íon bicarbonato (HCO_3^-) com a perda de um próton.



Mesmo na ausência de um catalisador, essa reação de hidratação ocorre em uma velocidade moderadamente rápida. A 37°C, perto do pH neutro, a constante de velocidade de segunda ordem k_1 é de 0,0027 M^{-1} s^{-1}. Esse valor corresponde a uma constante efetiva de primeira ordem de 0,15 s^{-1} na água ($[H_2O]$ = 55,5 M). A reação inversa, isto é, a desidratação do HCO_3^-, é ainda mais rápida, com constante de velocidade k_1 = 50 s^{-1}. Essas constantes de velocidade correspondem a uma constante de equilíbrio de $K_1 = 5{,}4 \times 10^{-5}$ e a uma razão entre $[CO_2]$ e $[H_2CO_3]$ de 340:1 em equilíbrio.

A hidratação do dióxido de carbono e a desidratação do HCO_3^- são frequentemente acopladas a processos rápidos, particularmente processos de transporte. Assim, quase todos os organismos contêm enzimas, denominadas *anidrases carbônicas*, que aumentam a velocidade da reação além da velocidade espontânea já razoável. Por exemplo, as anidrases carbônicas desidratam o HCO_3^- no sangue, formando CO_2 para ser exalado durante a passagem do sangue pelos pulmões. Em contrapartida, convertem o CO_2 em HCO_3^- para produzir o humor aquoso dos olhos e em outras secreções. Além disso, tanto o CO_2 quanto o HCO_3^- são substratos e produtos para uma variedade de enzimas, e a interconversão rápida dessas espécies pode ser necessária para assegurar níveis apropriados de substrato. Essas enzimas são tão importantes para os seres humanos que foram encontradas mutações em algumas anidrases carbônicas associadas à osteopetrose (formação excessiva de ossos densos, acompanhada de anemia) e retardo mental.

As anidrases carbônicas aceleram acentuadamente a hidratação do CO_2. As enzimas mais ativas hidratam o CO_2 em velocidades tão altas quanto $k_{cat} = 10^6$ s^{-1}, ou um milhão de vezes por segundo por molécula de enzima. Processos físicos fundamentais, como a difusão e a transferência de prótons, normalmente limitam a velocidade de hidratação, de modo que as enzimas empregam estratégias especiais para alcançarem essas velocidades prodigiosas.

A anidrase carbônica contém um íon zinco ligado, que é essencial para a atividade catalítica

Menos de 10 anos após a descoberta da anidrase carbônica, em 1932, foi constatado que essa enzima continha um íon zinco ligado. Além disso, o íon zinco parecia ser necessário para a atividade catalítica. Essa descoberta, que foi notável na época, fez da anidrase carbônica a primeira enzima conhecida contendo zinco. Na atualidade, são conhecidas centenas de enzimas que contêm zinco. De fato, mais de um terço de todas as enzimas contém íons metálicos ligados ou necessitam da adição

desses íons para a sua atividade. Os íons metálicos têm várias propriedades que aumentam a reatividade química: suas cargas positivas, sua capacidade de formar ligações fortes, porém cineticamente lábeis, e, em alguns casos, a sua capacidade de permanecer estáveis em mais de um estado de oxidação. A reatividade química dos íons metálicos explica por que as estratégias catalíticas que empregam íons metálicos foram adotadas durante toda a evolução.

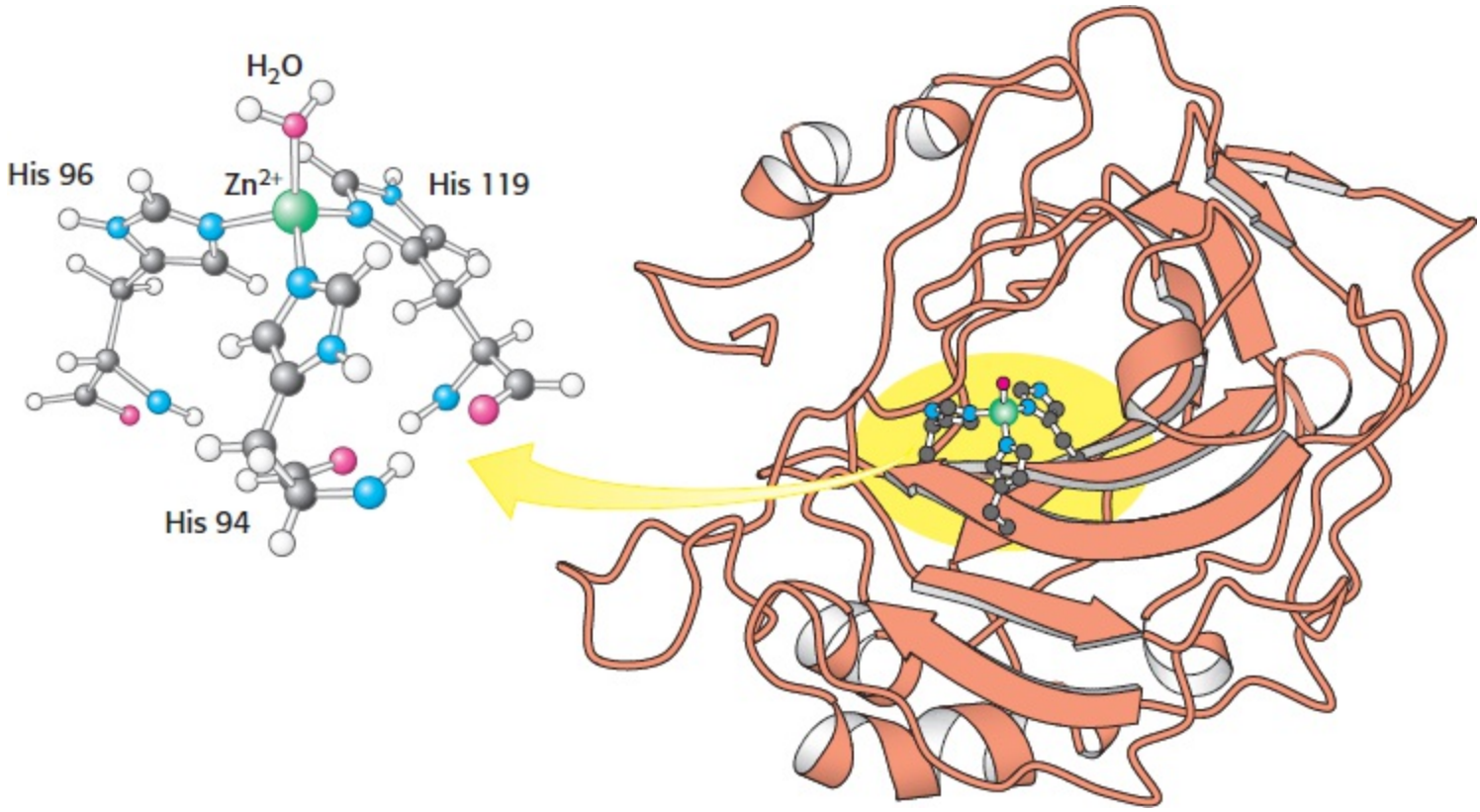


Figura 9.21 A estrutura da anidrase carbônica II humana e seu sítio para o zinco. (À esquerda) *Observe* que o íon zinco está ligado aos anéis imidazólicos de três resíduos de histidina, bem como a uma molécula de água. (À direita) *Observe* a localização do sítio de zinco em uma fenda próximo ao centro da enzima. [Desenhada a partir de 1CA2.pdb.]

Estudos de cristalografia de raios X forneceram informações mais detalhadas e diretas sobre o local do zinco na anidrase carbônica. Os seres humanos têm, pelo menos, sete anidrases carbônicas, cada uma delas com o seu próprio gene. Todas são claramente homólogas, conforme demonstrado pela identidade substancial de sequência. A anidrase carbônica II, uma proteína importante encontrada nos eritrócitos, tem sido a mais extensamente estudada (Figura 9.21). Trata-se também de uma das anidrases carbônicas mais ativas.

O zinco é encontrado apenas no estado +2 em sistemas biológicos. Um átomo de zinco está essencialmente sempre ligado a quatro ou mais ligantes; na anidrase carbônica, três sítios de coordenação são ocupados pelos anéis imidazólicos de três resíduos de histidina, e um sítio de coordenação adicional é ocupado por uma molécula de água (ou por um íon hidróxido, dependendo do pH). Como as moléculas que ocupam os sítios de coordenação são neutras, a carga global na unidade $Zn(His)_3$ continua sendo +2.

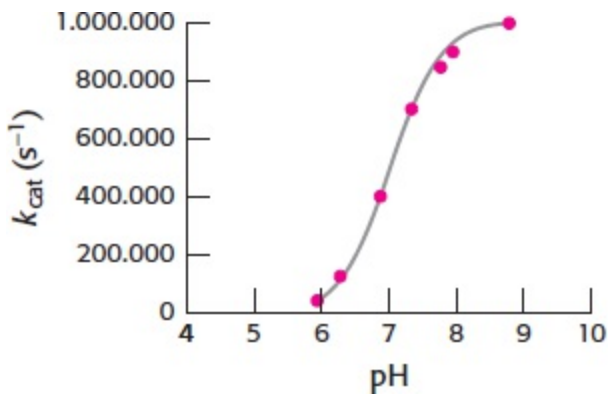


Figura 9.22 Efeito do pH sobre a atividade da anidrase carbônica. Mudanças do pH alteram a velocidade de hidratação do dióxido de carbono catalisada pela anidrase carbônica II. A enzima tem uma atividade máxima em pH alto.

A catálise acarreta a ativação de uma molécula de água pelo zinco

Como esse complexo de zinco facilita a hidratação do dióxido de carbono? Uma importante pista provém do perfil de pH da hidratação do dióxido de carbono catalisada enzimaticamente (Figura 9.22).

Em pH 8, a reação ocorre próximo à sua velocidade máxima. À medida que o pH diminui, a velocidade da reação cai. O ponto médio dessa transição é próximo do pH 7, sugerindo que um grupo que perde um próton em pH 7 ($pK_a = 7$) desempenha um importante papel na atividade da anidrase carbônica. Além disso, a curva sugere que a forma desprotonada (pH alto) desse grupo participa mais efetivamente na catálise. Embora alguns aminoácidos, notavelmente a histidina, tenham valores de pK_a próximos a 7, *há diversas evidências de que o grupo responsável por essa transição não é um aminoácido, mas a molécula de água ligada ao zinco.*

A ligação de uma molécula de água ao centro do zinco de carga positiva reduz o pK_a da molécula de água de 15,7 para 7 (Figura 9.23).

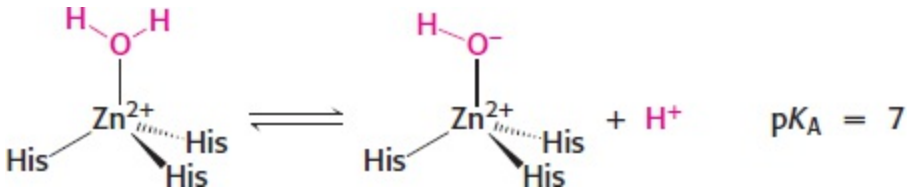


Figura 9.23 O pK_a da água ligada ao zinco. A ligação ao zinco reduz o valor de pK_a da água, de 15,7 para 7.

Com a redução do valor de pK_a, muitas moléculas de água perdem um próton em pH neutro, gerando uma concentração substancial de íon hidróxido (ligado ao átomo de zinco). Um íon hidróxido (OH^-) ligado ao zinco atua como poderoso nucleófilo, capaz de atacar o dióxido de carbono muito mais prontamente do que a água. Adjacente ao sítio do zinco, a anidrase carbônica também apresenta uma placa hidrofóbica que atua como sítio de ligação para o dióxido de carbono (Figura 9.24). Com base nessas observações, pode-se propor um mecanismo simples para a hidratação do dióxido de carbono (Figura 9.25):

1. O íon zinco facilita a liberação de um próton de uma molécula de água, gerando um íon hidróxido.

2. O substrato dióxido de carbono liga-se ao sítio ativo da enzima e é posicionado para reagir com o íon hidróxido.

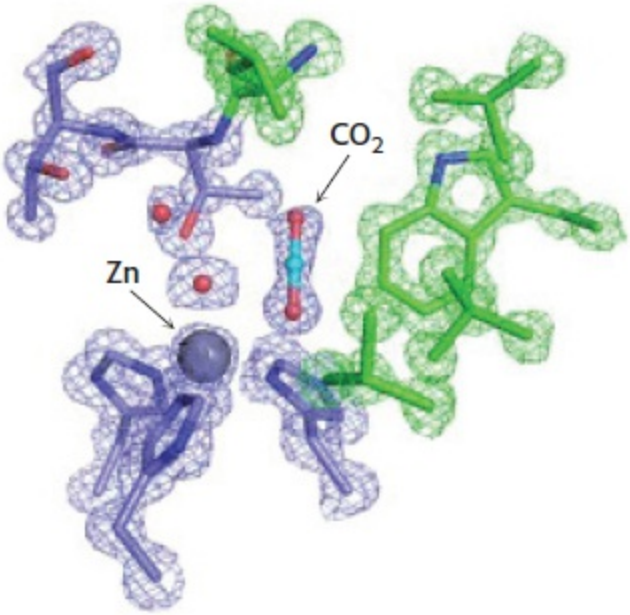


Figura 9.24 Sítio de ligação do dióxido de carbono. Cristais de anidrase carbônica foram expostos ao gás dióxido de carbono em alta pressão e baixa temperatura, e foram coletados os dados de difração dos raios X. A elétron-densidade para o dióxido de carbono, claramente visível em local adjacente ao zinco e à sua água ligada, revela o sítio de ligação do dióxido de carbono. [De J. F. Domsic, B. S. Awaru, C. U. Kim, S. M. Gruner, M. Agbandje-McKenna, D. N. Silverman, and R. McKenna. J. *Biol. Chem*. 283:30766-30771, 2008.]

3. O íon hidróxido ataca o dióxido de carbono, convertendo-o em íon bicarbonato, HCO_3^-.

4. O sítio catalítico é regenerado com a liberação de HCO_3^- e a ligação de outra molécula de água.

Por conseguinte, a ligação de uma molécula de água ao íon zinco favorece a formação do estado de transição ao facilitar a liberação de próton e ao posicionar a molécula de água em estreita proximidade com o outro reagente.

Estudos de um modelo de *um análogo sintético* fornecem evidências para a plausibilidade desse mecanismo. Um ligante sintético simples liga-se ao zinco por meio de quatro átomos de nitrogênio (em comparação com três átomos de nitrogênio da histidina na enzima), como mostra a Figura 9.26. Uma molécula de água permanece ligada ao íon zinco no complexo. As medições diretas revelam que essa molécula de água tem um valor de pK_a de 8,7, não tão baixo quanto o valor para a molécula de água na anidrase carbônica, porém substancialmente mais baixo que o valor para a água livre. Em pH 9,2, esse complexo acelera a hidratação do dióxido de carbono em mais de 100 vezes. Embora a sua velocidade de catálise seja muito menos eficiente que a da catálise pela anidrase carbônica, o sistema modelo sugere fortemente a probabilidade de o mecanismo do hidróxido ligado ao zinco estar correto. As anidrases carbônicas evoluíram para utilizar a reatividade intrínseca de um íon hidróxido ligado ao zinco como potente catalisador.

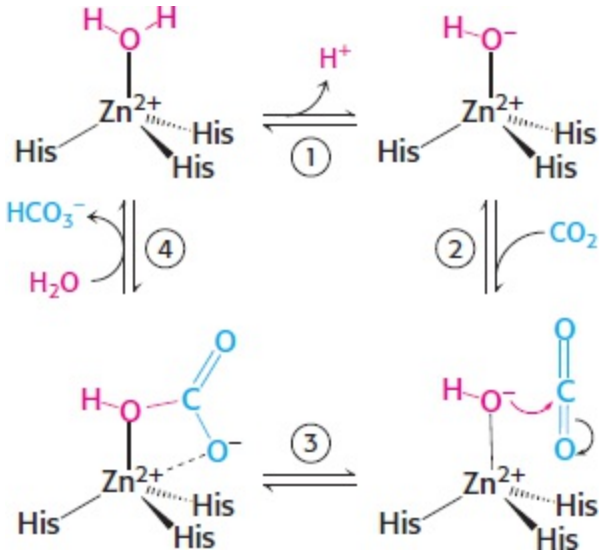


Figura 9.25 Mecanismo da anidrase carbônica. O mecanismo do hidróxido ligado ao zinco para a hidratação do dióxido de carbono revela um aspecto da catálise de íons metálicos. A relação ocorre em quatro etapas: **1.** desprotonação da água; **2.** ligação do dióxido de carbono; **3.** ataque nucleofílico do dióxido de carbono pelo hidróxido; **4.** deslocamento do íon bicarbonato pela água.

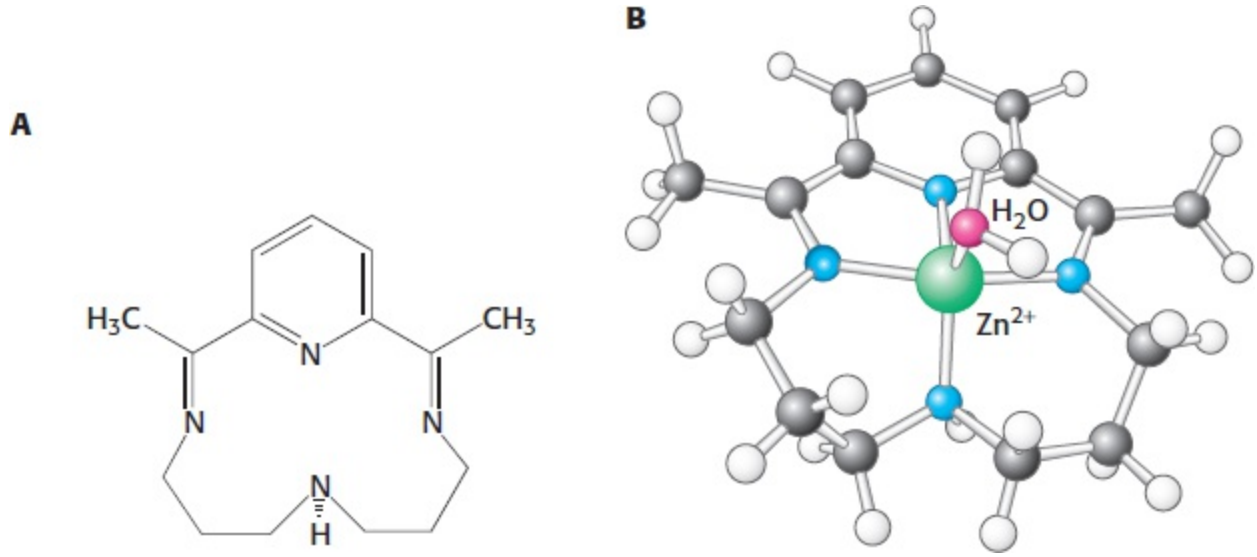


Figura 9.26 Um modelo com um análogo sintético para a anidrase carbônica. A. Um composto orgânico, capaz de se ligar ao zinco, foi sintetizado como modelo para a anidrase carbônica. O complexo de zinco com esse ligante acelera a hidratação do dióxido de carbono em mais de 100 vezes em condições apropriadas. **B.** Estrutura do suposto complexo ativo presumido, mostrando o zinco ligado ao ligante e a uma molécula de água.

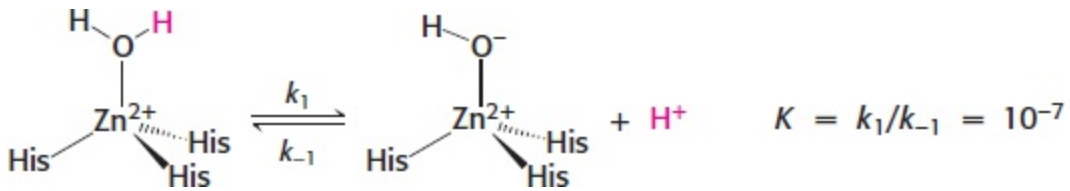


Figura 9.27 Cinética da desprotonação da água. A cinética da desprotonação e protonação da molécula de água ligada ao zinco na anidrase carbônica.

Uma lançadeira de prótons facilita a rápida regeneração da forma ativa da enzima

Conforme assinalado anteriormente, algumas anidrases carbônicas podem hidratar o dióxido de carbono em velocidades de até um milhão de vezes por segundo (10^6 s^{-1}). A magnitude dessa

velocidade pode ser compreendida a partir das seguintes observações. Na primeira etapa de uma reação de hidratação do dióxido de carbono, a molécula de água ligada ao zinco precisa perder um próton para regenerar a forma ativa da enzima (Figura 9.27). A velocidade da reação inversa, isto é, a protonação do íon hidróxido ligado ao zinco, é limitada pela taxa de difusão de prótons. Os prótons difundem-se muito rapidamente, com constantes de velocidade de segunda ordem próximas de 10^{-11} M^{-1} s^{-1}. Por conseguinte, a constante de velocidade reversa k^{-1} precisa ser inferior a 10^{-11} M^{-1} s^{-1}. Como a constante de equilíbrio K é igual a k_1/k_{-1}, a constante de velocidade da reação direta é fornecida por $k_1 = K \cdot k^{-1}$. Assim, se $k^{-1} \leq 10^{11}$ M^{-1} e $K = 10^{-7}$ M (visto que $pK_a = 7$), então k_1 precisa ser inferior ou igual a 10^4 s^{-1}. Em outras palavras, a taxa de difusão de prótons limita a taxa de sua liberação para menos de 10^4 s^{-1} para um grupo com $pK_a = 7$. Entretanto, se o dióxido de carbono for hidratado a uma velocidade de 10^6 s^{-1}, cada etapa no mecanismo (Figura 9.25) precisará ocorrer pelo menos nessa velocidade. Como esse aparente paradoxo é resolvido?

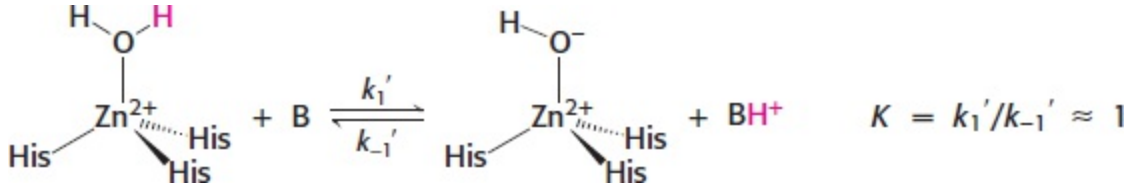


Figura 9.28 Efeito do tampão na desprotonação. A desprotonação da molécula de água ligada ao zinco na anidrase carbônica é auxiliada pelo componente B do tampão.

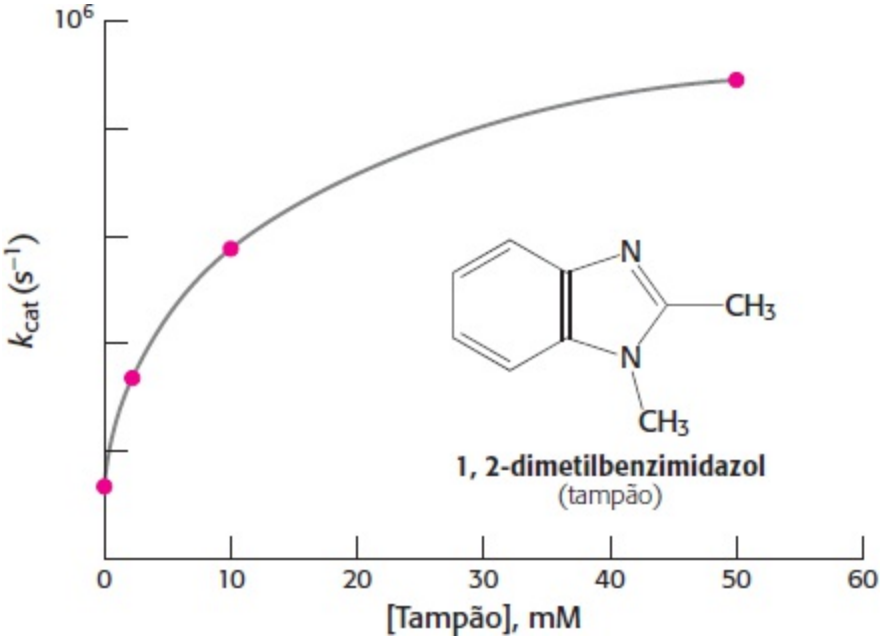


Figura 9.29 Efeito da concentração de tampão sobre a taxa de hidratação do dióxido de carbono. A velocidade de hidratação do dióxido de carbono aumenta com a concentração do tampão 1,2-dimetilbenzimidazol. O tampão faz com que a enzima alcance alta velocidade de catálise.

A resposta ficou clara com o reconhecimento de que *as maiores velocidades de hidratação de dióxido de carbono requerem a presença de tampão, sugerindo que os componentes do tampão participam na reação.* O tampão pode ligar-se a prótons ou liberá-los. A vantagem é que, enquanto as concentrações de prótons e de íons hidróxido estão limitadas a 10^{-7} em pH neutro, a concentração de componentes do tampão pode ser muito mais alta, da ordem de vários milimolares. Se o componente BH^+ do tampão tiver pK_a de 7 (equivalente ao da molécula de água ligada ao zinco), a

constante de equilíbrio para a reação na Figura 9.28 será 1. A taxa de retirada de prótons é dada por $k_1' \cdot$ [B]. As constantes de velocidade de segunda ordem k_1' e k_{-1}' serão limitadas pela difusão do tampão a valores abaixo de aproximadamente 10^9 M^{-1} s^{-1}. Por conseguinte, as concentrações do tampão acima de [B] = 10^{-3} M (1 mM) podem ser altas o suficiente para sustentar uma velocidade de hidratação do dióxido de carbono de 10^6 M^{-1} s^{-1}, visto que $k_1' \cdot$ [B] = (10^9 M^{-1} s^{-1}) · (10^{-3} M) = 10^6 s^{-1}. Essa previsão é confirmada experimentalmente (Figura 9.29).

Os componentes moleculares de muitos tampões são demasiado grandes para alcançar o sítio ativo da anidrase carbônica. A anidrase carbônica II evoluiu uma *lançadeira de prótons* para possibilitar a participação de componentes do tampão na reação a partir da solução. O principal componente dessa lançadeira é a histidina 64. Esse resíduo transfere prótons da molécula de água ligada ao zinco para a superfície da proteína e, em seguida, para o tampão (Figura 9.30). Por conseguinte, a função de catálise foi intensificada pela evolução de um sistema de controle de transferência de prótons a partir do sítio ativo e para ele. Como os prótons participam de muitas reações bioquímicas, a manipulação da relação de prótons dentro dos sítios ativos é crucial para a função de muitas enzimas e explica a proeminência da catálise ácido-base.

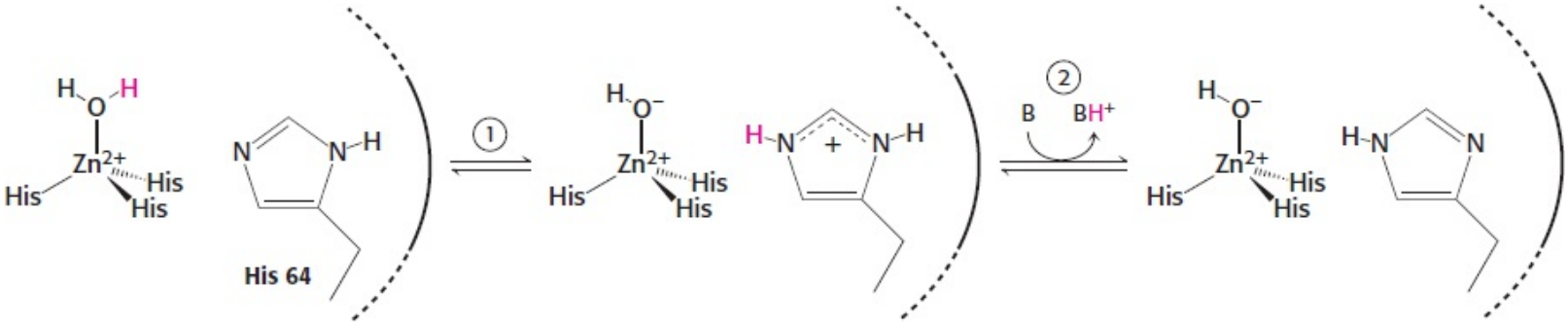


Figura 9.30 Lançadeira de prótons da histidina. 1. A histidina 64 retira um próton da molécula de água ligada ao zinco, gerando um íon hidróxido nucleofílico e uma histidina protonada. **2.** O tampão (B) remove um próton da histidina regenerando a forma desprotonada.

A evolução convergente gerou sítios ativos com zinco em diferentes anidrases carbônicas

Anidrases carbônicas homologas às enzimas humanas, designadas como anidrases carbônicas α, são comuns em animais e em algumas bactérias e algas. Além disso, foram descobertas duas outras famílias de anidrases carbônicas. As proteínas dessas famílias contêm o íon zinco necessário para a atividade catalítica, porém não têm sequências significativamente semelhantes às *anidrases carbônicas* α. As *anidrases carbônicas* β são encontradas em plantas superiores e em muitas espécies de bactérias, inclusive *E. coli*. Os estudos espectroscópicos e estruturais revelam que o íon zinco está ligado por um resíduo de histidina e por dois de cisteína. Além disso, as estruturas globais das enzimas não estão relacionadas com aquelas das anidrases carbônicas α. Nas plantas, essas enzimas facilitam o acúmulo de dióxido de carbono, que é crucial para o ciclo de Calvin na fotossíntese. Uma terceira família, as *anidrases carbônicas* γ, foi inicialmente identificada em *Methanosarcina thermophila*, pertencente às *archaea*. A estrutura cristalográfica dessa enzima revela três sítios de zinco extremamente semelhantes àquele das anidrases carbônicas α. Todavia, neste caso, os três sítios de zinco situam-se nas interfaces entre as três subunidades de uma enzima trimérica (Figura 9.31). A estrutura β-helicoidal de mão esquerda (uma fita β torcida em uma hélice com giro para a esquerda) desta enzima também difere de qualquer estrutura das anidrases

carbônicas α e β. Por conseguinte, a evolução convergente produziu anidrases carbônicas que dependem de íons zinco coordenados pelo menos três vezes.

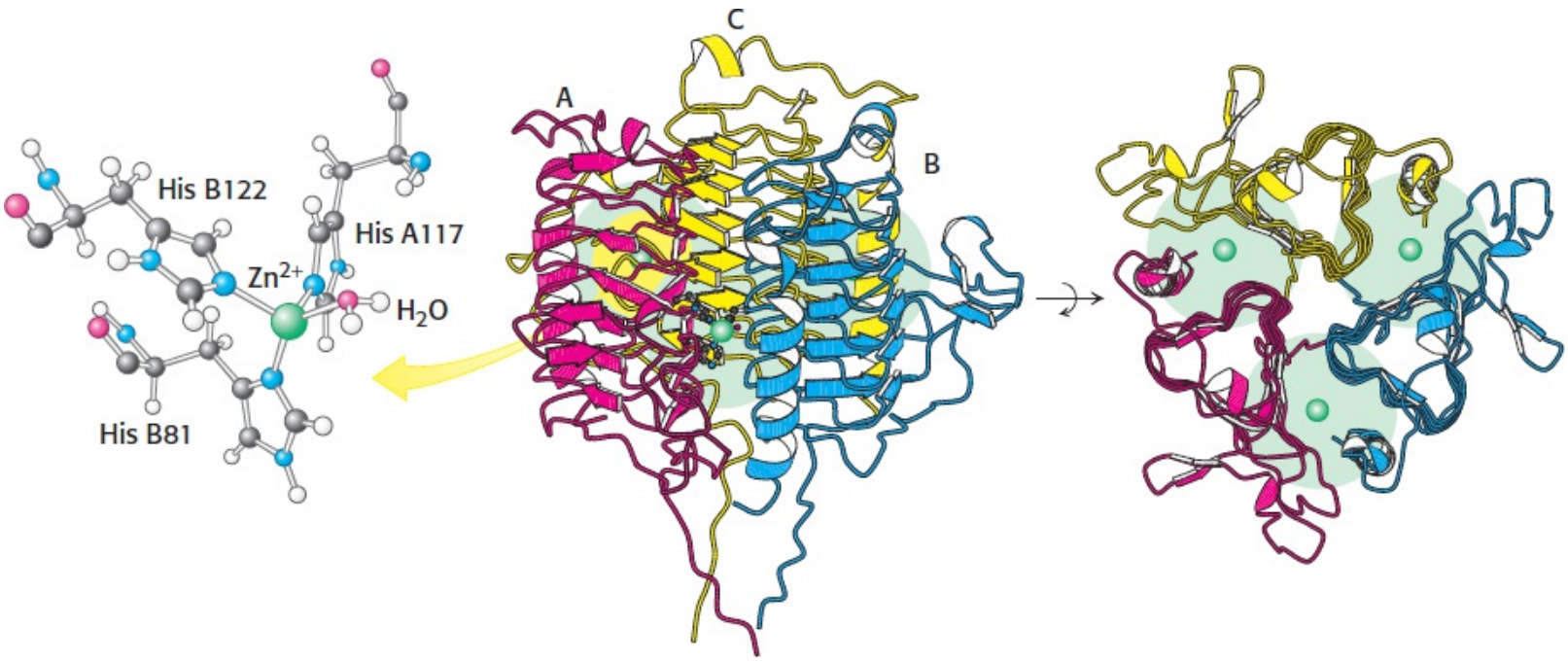


Figura 9.31 Anidrase carbônica γ. (À esquerda) O sítio de zinco da anidrase carbônica γ. *Observe* que o íon zinco ligado à água está ligado a três resíduos de histidina. (No centro) A estrutura trimérica da proteína (as cadeias individuais são designadas como A, B e C). Cada cadeia é constituída principalmente de uma hélice β de mão esquerda. (À direita). A proteína foi girada para mostrar a vista de cima para baixo, que ressalta a sua simetria tríplice. *Observe* a posição dos sítios de zinco (verde) nas interfaces entre as subunidades. [Desenhada a partir de 1THJ.pdb.]

9.3 As enzimas de restrição catalisam reações de clivagem do DNA altamente específicas

Consideraremos a seguir uma reação de hidrólise que resulta em clivagem do DNA. As bactérias e as *archaea* desenvolveram mecanismos para se protegerem das infecções virais. Muitos vírus injetam seus genomas de DNA em células; uma vez no seu interior, o DNA viral assume a maquinaria da célula para acionar a produção de proteínas virais e, por fim, da progênie de vírus. Com frequência, uma infecção viral resulta na morte da célula hospedeira. Uma importante estratégia protetora para o hospedeiro consiste em utilizar *endonucleases de restrição* (enzimas de restrição) para degradar o DNA viral quando é introduzido em uma célula. Essas enzimas reconhecem sequências particulares de bases, denominadas *sequências de reconhecimento ou sítios de reconhecimento*, em seu DNA-alvo, e clivam esse DNA em posições definidas. Já consideramos a utilidade dessas enzimas importantes na dissecção de genes e genomas (Seção 5.2). A classe mais bem estudada de enzimas de restrição compreende as enzimas de restrição tipo II, que clivam o DNA *dentro* de suas sequências de reconhecimento. Outros tipos de enzimas de restrição clivam o DNA em posições ligeiramente distantes de seus sítios de reconhecimento.

As endonucleases de restrição devem exibir uma enorme especificidade em dois níveis. No primeiro, não devem degradar o DNA do hospedeiro contendo as sequências de reconhecimento. No segundo, devem clivar apenas moléculas de DNA que contenham sítios de reconhecimento (daqui para frente designadas como *DNA cognato*) sem clivar as moléculas de DNA que carecem desses

sítios. Como essas enzimas conseguem degradar o DNA viral e, ao mesmo tempo, preservar o seu próprio DNA? Em *E. coli*, a endonuclease de restrição *Eco*RV cliva moléculas de DNA virais de dupla fita que contêm a sequência 5′-GATATC-3′, porém deixa intacto o DNA do hospedeiro contendo centenas dessas sequências. No final dessa seção, retornaremos à estratégia pelas quais as células hospedeiras protegem o seu próprio DNA.

As enzimas de restrição devem clivar o DNA apenas nos sítios de reconhecimento, sem clivar outros locais. Suponhamos que uma sequência de reconhecimento tenha 6 pares de base. Como existem 4^6 ou 4.096 sequências com seis pares de bases, a concentração de sítios que não devem ser clivados será aproximadamente 4.000 vezes maior do que a concentração de sítios que devem ser clivados. Por conseguinte, para não danificar o DNA da célula hospedeira, as enzimas de restrição precisam clivar moléculas de DNA cognato com uma eficiência muito maior que 4.000 vezes a eficiência de clivagem de sítios inespecíficos. Voltaremos ao mecanismo empregado para alcançar a alta especificidade necessária após considerarmos a química do processo de clivagem.

A clivagem ocorre por deslocamento em linha do oxigênio 3′ do fósforo pela água ativada por magnésio

Uma endonuclease de restrição catalisa a hidrólise do arcabouço de fosfodiéster do DNA. Especificamente, a ligação entre o átomo de oxigênio 3′ e o átomo de fósforo é rompida. Os produtos dessa reação consistem em fitas de DNA com um grupo hidroxila 3′ livre e um grupo fosforila 5′ no sítio de clivagem (Figura 9.32). Essa reação ocorre por ataque nucleofílico no átomo de fósforo. Consideraremos dois mecanismos alternativos, sugeridos por analogia com as proteases. A endonuclease de restrição pode clivar o DNA pelo mecanismo 1, por meio de um intermediário covalente, empregando um potente nucleófilo (Nu), ou pelo mecanismo 2, mediante hidrólise direta:

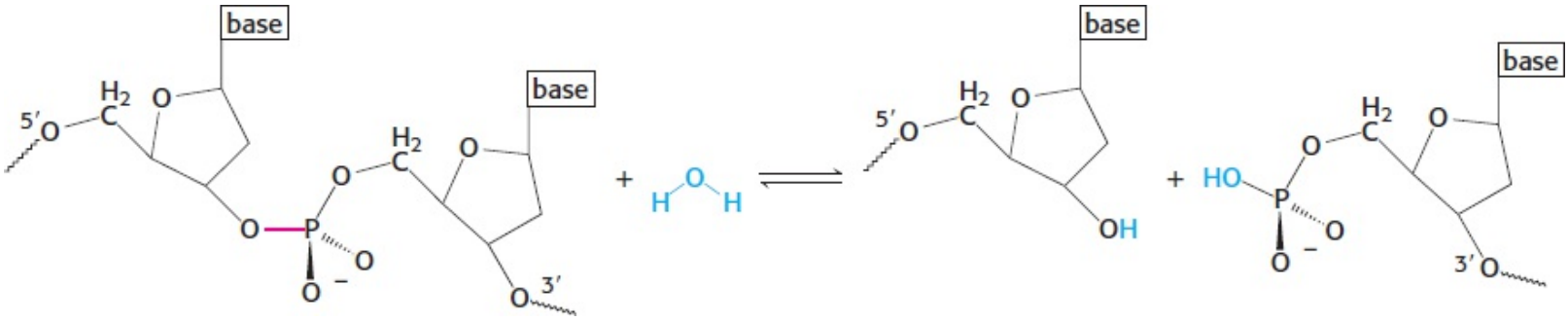
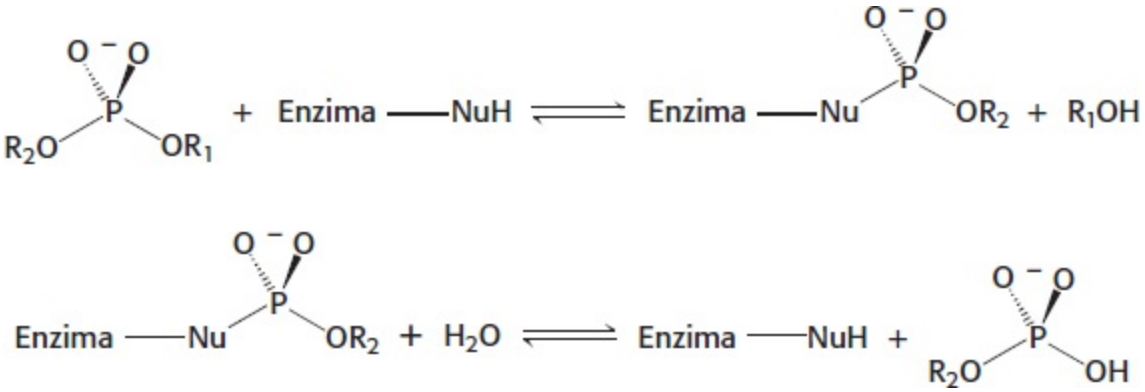
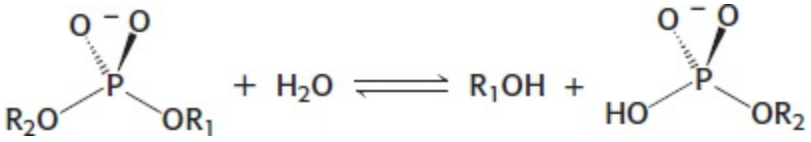


Figura 9.32 Hidrólise de uma ligação fosfodiéster. Todas as enzimas de restrição catalisam a hidrólise de ligações fosfodiéster do DNA, deixando um grupo fosforila ligado à extremidade 5′. A ligação que é clivada é mostrada em vermelho.

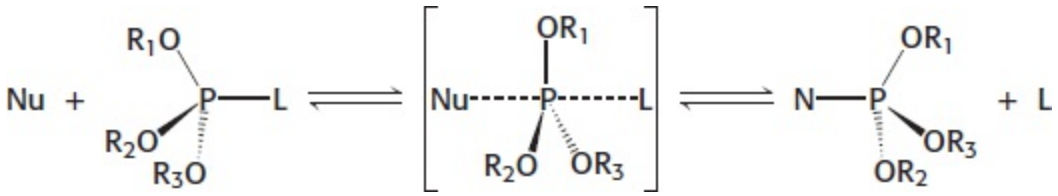
Mecanismo 1 (intermediário covalente)



Mecanismo 2 (hidrólise direta)



Cada mecanismo postula um nucleófilo diferente para atacar o átomo de fósforo. Em qualquer um dos casos, cada reação ocorre por *deslocamento em linha*:



O nucleófilo que chega ataca o átomo de fósforo, e forma-se um estado de transição pentacoordenado. Essa espécie tem uma geometria bipiramidal triangular, centrada no átomo de fósforo, com o nucleófilo que chega no ápice das duas pirâmides, e o grupo que é deslocado (o grupo que sai L) no outro ápice. Observe que o deslocamento inverte a conformação estereoquímica no átomo de fósforo tetraédrico, análogo à interconversão das configurações R e S em torno de um centro tetraédrico de carbono (Seção 2.1).

Os dois mecanismos diferem no número de vezes que ocorre o deslocamento durante a reação. No primeiro tipo de mecanismo, um nucleófilo na enzima (análogo à serina 195 da quimiotripsina) ataca o grupo fosfato, formando um intermediário covalente. Em uma segunda etapa, esse intermediário é hidrolisado levando à formação dos produtos finais. Nesse caso, ocorrem duas reações de deslocamento no átomo de fósforo. Em consequência, a configuração estereoquímica no átomo de fósforo deve ser invertida e, em seguida, mais uma vez invertida, e a configuração global é conservada. No segundo tipo de mecanismo, análogo àquele utilizado pela aspartil protease e metaloprotease, uma molécula de água ativada ataca diretamente o átomo de fósforo. Nesse mecanismo, ocorre uma única reação de deslocamento no átomo de fósforo. Por conseguinte, a configuração estereoquímica do átomo de fósforo é *invertida* após a clivagem. Para determinarmos o mecanismo correto, examinaremos a estereoquímica do átomo de fósforo após a clivagem.

Uma dificuldade é o fato de que a estereoquímica não é facilmente observada, visto que dois dos grupos ligados ao átomo de fósforo são átomos de oxigênio simples, idênticos um ao outro. Essa dificuldade pode ser contornada pela substituição de um átomo de oxigênio por enxofre (produzindo uma espécie denominada fosforotioato). Consideremos a endonuclease *Eco*RV. Essa enzima cliva a

ligação fosfodiéster entre T e A no centro da sequência de reconhecimento 5′-GATATC-3′. A primeira etapa consiste na síntese de um substrato apropriado para a *Eco*RV contendo fosforotioatos nos sítios de clivagem (Figura 9.33). Em seguida, a reação é efetuada em água que foi acentuadamente enriquecida em ^{18}O para possibilitar a marcação do átomo de oxigênio que chega. A localização do ^{18}O em relação ao átomo de enxofre indica se a reação ocorre com inversão ou retenção da estereoquímica. *A análise revelou que a configuração estereoquímica no átomo de fósforo foi invertida apenas uma vez com a clivagem.* Esse resultado é compatível com um ataque direto do átomo de fósforo pela água e exclui a formação de qualquer intermediário ligado covalentemente (Figura 9.34).

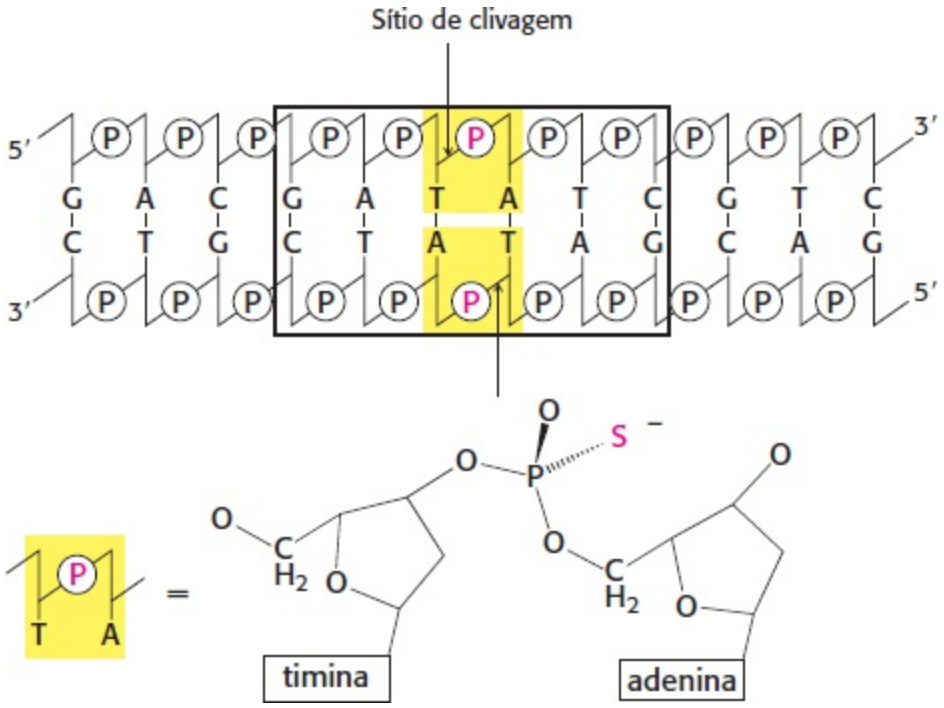


Figura 9.33 Marcação com fosforotioatos. Os grupos fosforotioatos, em que um dos átomos de oxigênio sem ponte é substituído por um átomo de enxofre, podem ser usados para marcar sítios específicos no arcabouço do DNA, a fim de determinar o curso estereoquímico global de uma reação de deslocamento. Aqui, um fosforotioato é colocado em sítios que podem ser clivados pela endonuclease *Eco*RV.

As enzimas de restrição necessitam de magnésio para a atividade catalítica

Muitas enzimas que atuam em substratos contendo fosfato necessitam de Mg^{2+} ou de algum outro cátion divalente semelhante para a sua atividade. Um ou mais cátions Mg^{2+} (ou cátions semelhantes) são essenciais para a função das endonucleases de restrição. Quais são as funções desses íons metálicos?

A visualização direta do complexo entre a endonuclease *Eco*RV e as moléculas de DNA cognato na presença de Mg^{2+} por cristalografia não tem sido possível, visto que a enzima cliva o substrato nessas circunstâncias. Entretanto, os complexos com íons metálicos podem ser visualizados por meio de diversas abordagens. Em uma delas, são preparados cristais de endonuclease *Eco*RV ligados a oligonucleotídios que contêm a sequência de reconhecimento da enzima. Esses cristais crescem na ausência de magnésio para impedir a clivagem; após a sua preparação, os cristais são embebidos em soluções contendo o metal. Alternativamente, foram desenvolvidos cristais com o uso de uma forma mutante da enzima que é menos ativa. Por fim, o Mg^{2+} pode ser substituído por íons metálicos, como

o Ca^{2+}, que se ligam, mas que não resultam em muita atividade catalítica. Em todos os casos, não ocorre nenhuma clivagem, de modo que as localizações dos sítios de ligação a íons metálicos podem ser prontamente determinados.

Foi constatada a presença de até três íons metálicos por sítio ativo. Os papéis desses múltiplos íons metálicos ainda estão em fase de investigação. Um sítio de ligação de íons é ocupado em praticamente todas as estruturas. Esse íon metálico é coordenado à proteína, mediante dois resíduos de aspartato, e a um dos átomos de oxigênio do grupo fosfato próximo ao sítio de clivagem. Esse íon metálico liga-se à molécula de água que ataca o átomo de fósforo, ajudando o seu posicionamento e ativando-o de modo semelhante ao íon Zn^{2+} da anidrase carbônica (Figura 9.35).

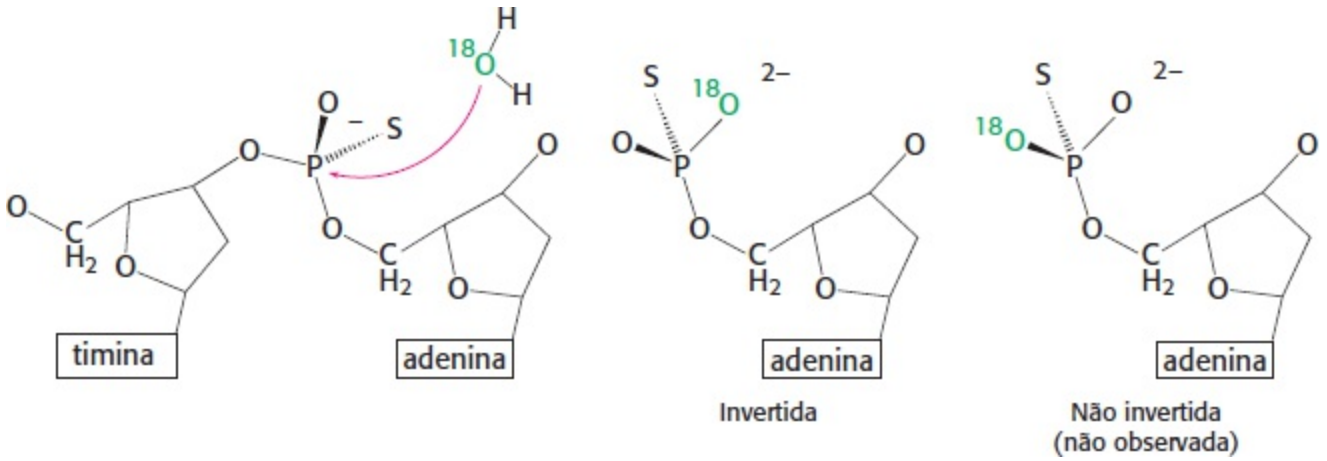


Figura 9.34 Estereoquímica do DNA clivado. A clivagem do DNA pela endonuclease *Eco*RV resulta em inversão global da configuração estereoquímica no átomo de fósforo, conforme indicado pela estereoquímica do átomo de fósforo ligado a um átomo de oxigênio da ponte, um ^{16}O, um ^{18}O e um átomo de enxofre. Essa configuração sugere fortemente que a hidrólise ocorre pelo ataque direto do átomo de fósforo pela água.

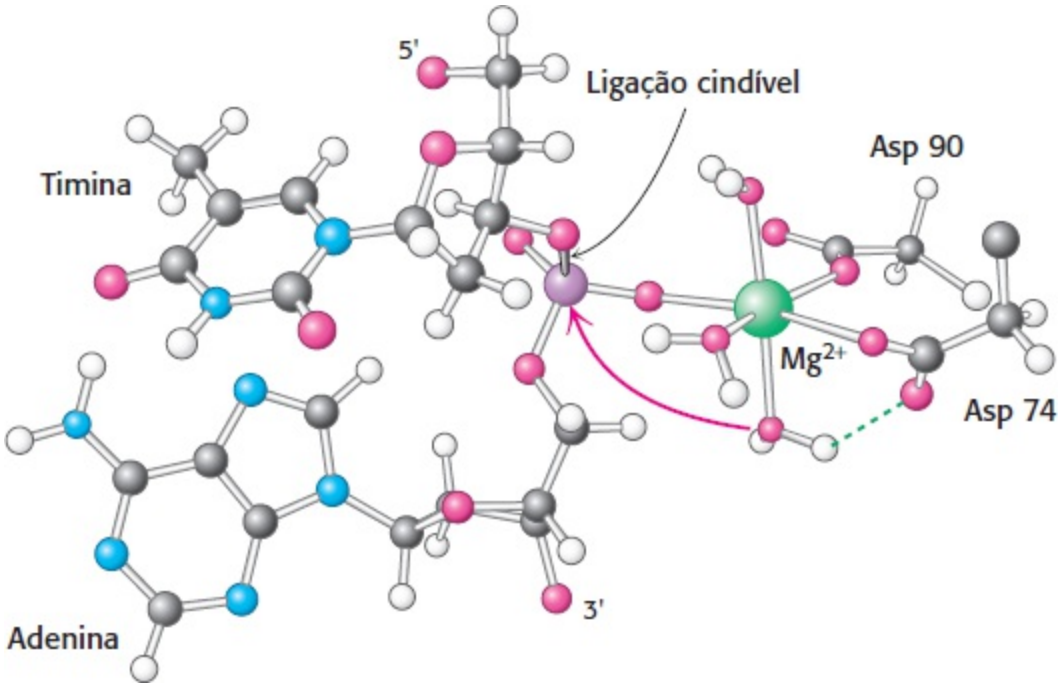


Figura 9.35 Um sítio de ligação do íon magnésio na endonuclease *Eco*RV. O íon magnésio ajuda a ativar uma molécula de água e a posiciona de modo que possa atacar o átomo de fósforo.

O aparelho catalítico completo só é montado dentro de complexos de moléculas de DNA cognato, assegurando a especificidade

Podemos agora retomar a questão da especificidade, a característica que define as enzimas de restrição. As sequências de reconhecimento para a maioria das endonucleases de restrição consistem em *repetições invertidas*. Esse arranjo confere à estrutura tridimensional do sítio de reconhecimento uma *simetria rotacional bilateral* (Figura 9.36).

As enzimas de restrição exibem uma simetria correspondente: trata-se de dímeros cujas duas subunidades estão relacionadas por simetria rotacional bilateral. A correspondência de simetria da sequência de reconhecimento e da enzima facilita o reconhecimento do DNA cognato pela enzima. Essa semelhança de estrutura foi confirmada pela determinação da estrutura do complexo entre a endonuclease *Eco*RV e fragmentos de DNA contendo a sua sequência de reconhecimento (Figura 9.37). A enzima envolve o DNA em um abraço apertado.

A especificidade é frequentemente determinada pela afinidade de ligação de uma enzima pelos substratos. Entretanto, de modo surpreendente, os estudos de ligação realizados na ausência de magnésio demonstraram que a endonuclease *Eco*RV se liga a todas as sequências, tanto cognatas quanto não cognatas, com afinidade aproximadamente igual. Por que, então, a enzima só cliva sequências cognatas? A resposta é encontrada em um conjunto singular de interações observadas entre a enzima e a sequência do DNA cognato.

Dentro da sequência 5′-GATATC-3′ as bases G e A na extremidade 5′ de cada fita e seus pares de Watson e Crick entram em contato direto com a enzima por pontes de hidrogênio com resíduos localizados em dois laços, cada um se projetando a partir da superfície de cada subunidade da enzima (Figura 9.37). A característica mais notável desse complexo é a *distorção do DNA*, que fica substancialmente dobrado no centro (Figura 9.38). Os dois pares de base TA centrais na sequência de reconhecimento desempenham um papel essencial na produção da dobra. Não estabelecem contato com a enzima, mas parecem ser necessários, em virtude da sua facilidade de distorção. Sabe-se que a sequência 5′-TA-3′está entre os pares de bases mais facilmente deformados.

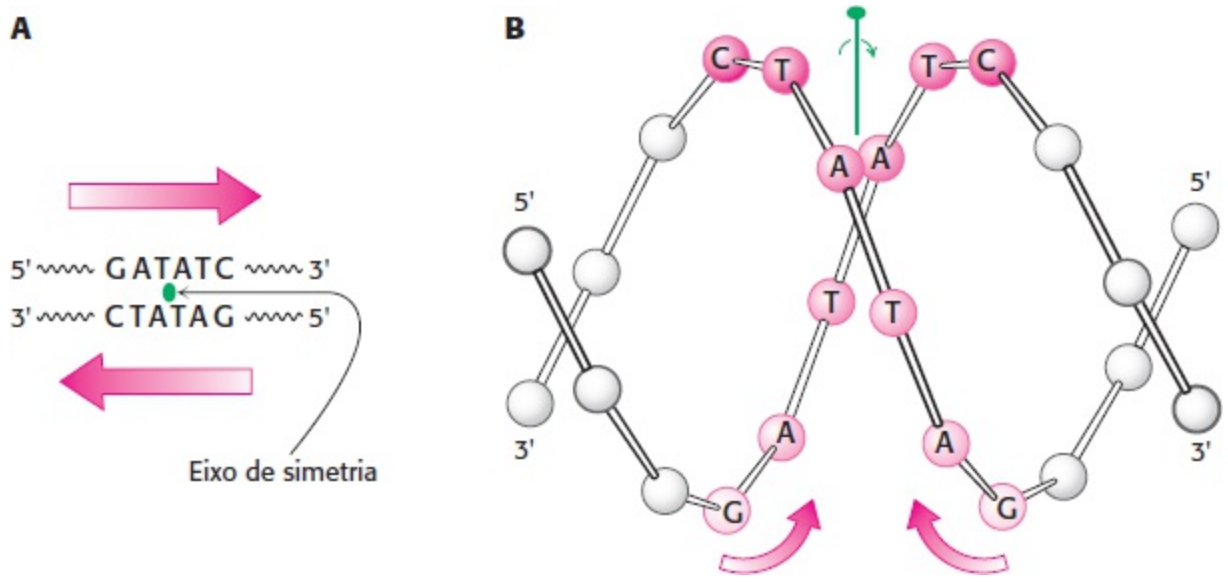


Figura 9.36 Estrutura do sítio de reconhecimento da endonuclease *Eco*RV. A. A sequência do sítio de reconhecimento, que é simétrica em torno do eixo de rotação representado em verde. **B**. A repetição invertida dentro da sequência de reconhecimento da *Eco*RV (e da maioria das outras endonucleases de restrição) confere ao sítio do DNA uma simetria rotacional bilateral.

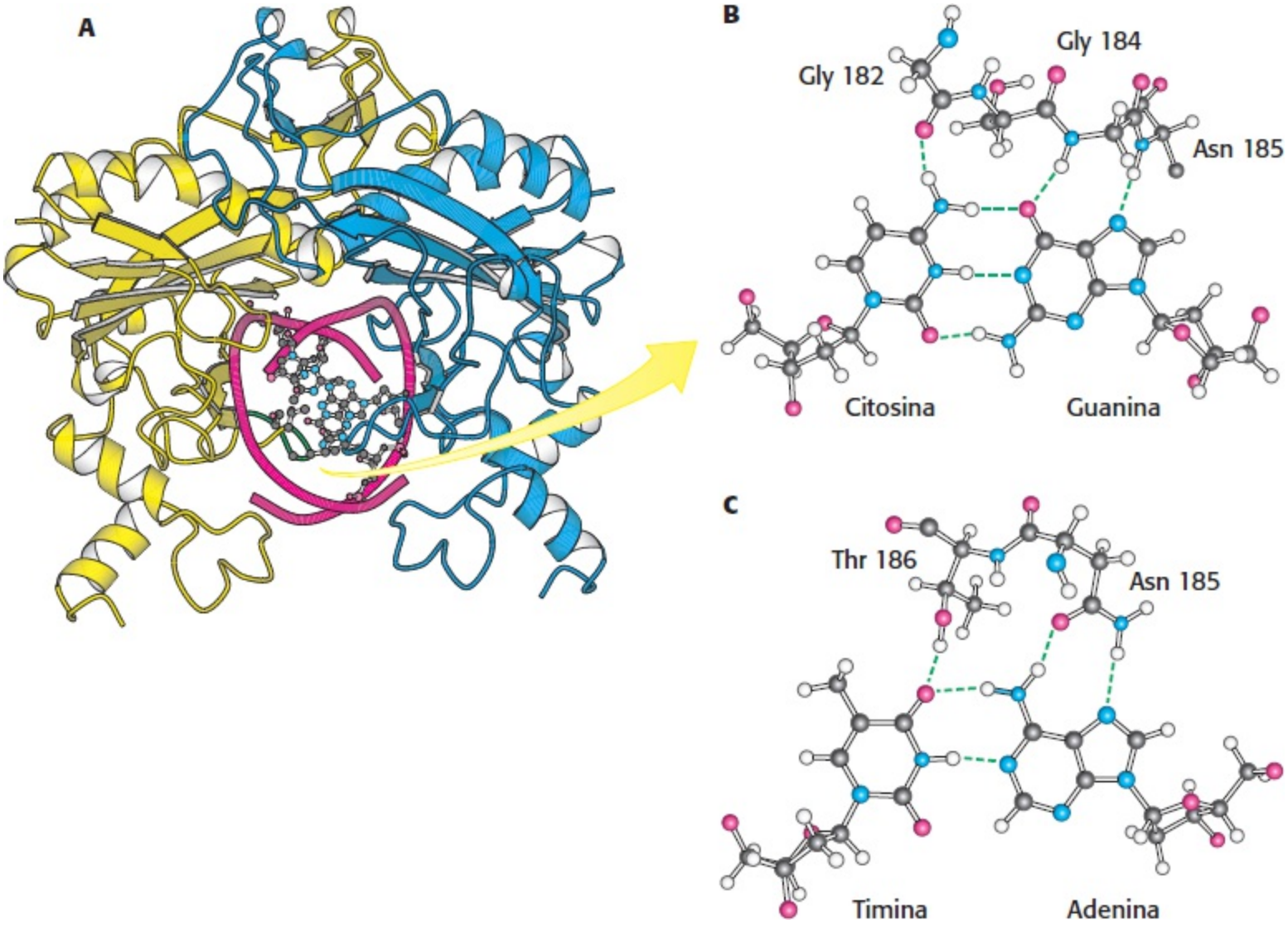


Figura 9.37 *Eco*RV envolvendo uma molécula de DNA cognato. **A**. Vista da estrutura da endonuclease *Eco*RV ligada a um fragmento de DNA cognato ao longo do eixo helicoidal do DNA. As duas subunidades de proteína estão em amarelo e azul, enquanto o arcabouço do DNA está em vermelho. *Observe* que os eixos bilaterais do dímero da enzima e o DNA estão alinhados. Um dos laços de ligação do DNA (em verde) da endonuclease *Eco*RV é mostrado interagindo com os pares de base em seu sítio de ligação do DNA cognato. Os resíduos de aminoácidos essenciais são mostrados fazendo pontes de hidrogênio com (**B**) um par de bases CG e (**C**) um par de bases AT. [Desenhada a partir de 1RVB.pdb.]

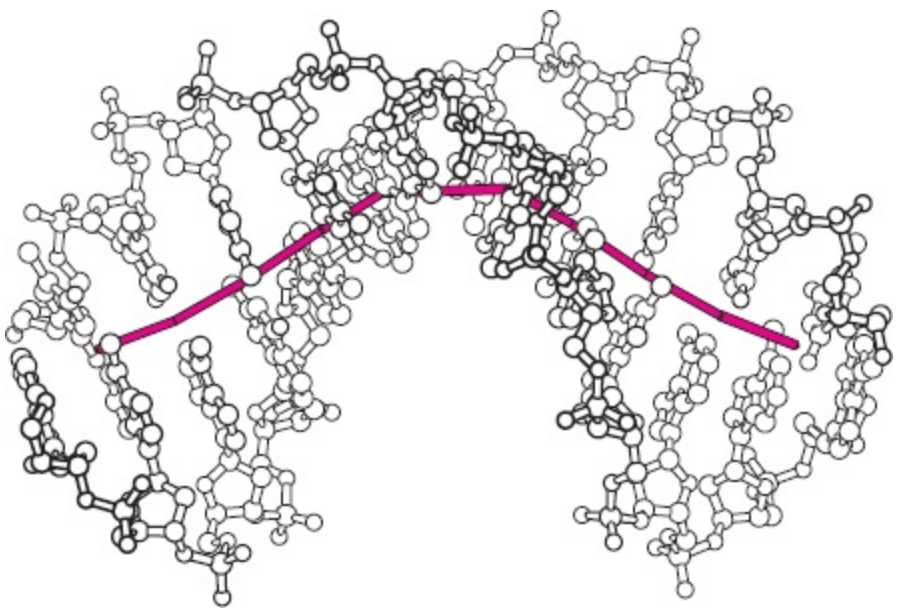


Figura 9.38 Distorção do sítio de reconhecimento. O DNA está representado em um modelo de esferas e bastões. O

trajeto do eixo helicoidal do DNA, mostrado em vermelho, é substancialmente distorcido com a ligação à enzima. Para a forma B do DNA, o eixo é reto (não mostrado).

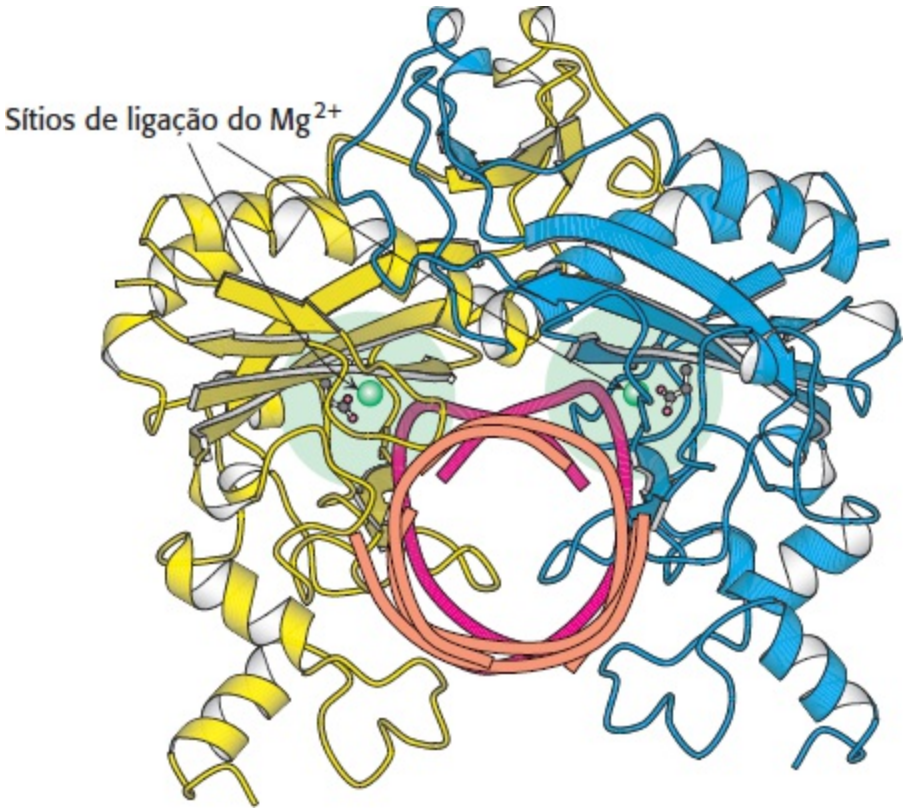


Figura 9.39 DNA inespecífico e cognato dentro da endonuclease *Eco*RV. Comparação das posições do DNA inespecífico (em laranja) e cognato (em vermelho) dentro da *Eco*RV. Observe que, no complexo inespecífico, o arcabouço do DNA está demasiado distante da enzima para completar os sítios de ligação do íon magnésio. [Desenhada a partir de 1RVB.pdb.]

As estruturas dos complexos formados com fragmentos de DNA não cognatos são notavelmente diferentes daquelas formadas com o DNA cognato: a conformação do DNA não cognato não é substancialmente distorcida (Figura 9.39). *Essa ausência de distorção tem consequências importantes no que diz respeito à catálise. Nenhum fosfato é posicionado próximo o suficiente dos resíduos de aspartato do sítio ativo para completar um sítio de ligação ao íon magnésio* (Figura 9.35). Por conseguinte, os complexos inespecíficos não se ligam aos íons magnésio, e nunca ocorre a montagem do aparelho catalítico completo. A distorção do substrato e a ligação subsequente do íon magnésio respondem pela especificidade catalítica de mais de 1.000.000 de vezes a que é observada para a endonuclease *Eco*RV. *Por conseguinte, a especificidade enzimática pode ser determinada pela especificidade de ação da enzima, e não pela especificidade de ligação ao substrato.*

Podemos agora analisar o papel da energia de ligação nessa estratégia para alcançar a especificidade catalítica. O DNA distorcido estabelece contatos adicionais com a enzima, aumentando a energia de ligação. Todavia, esse aumento na energia de ligação é cancelado pelo custo energético da distorção do DNA a partir de sua conformação relaxada (Figura 9.40). Assim, para a endonuclease *Eco*RV, existe pouca diferença na afinidade de ligação para fragmentos de DNA cognato e inespecífico. Entretanto, a distorção no complexo cognato afeta drasticamente a catálise ao completar o sítio de ligação ao íon magnésio. Esse exemplo ilustra como as enzimas podem utilizar a energia de ligação disponível para deformar substratos e estabilizá-los para transformação química. As interações que ocorrem dentro do complexo do substrato distorcido estabilizam o estado de

transição que leva à hidrólise do DNA.

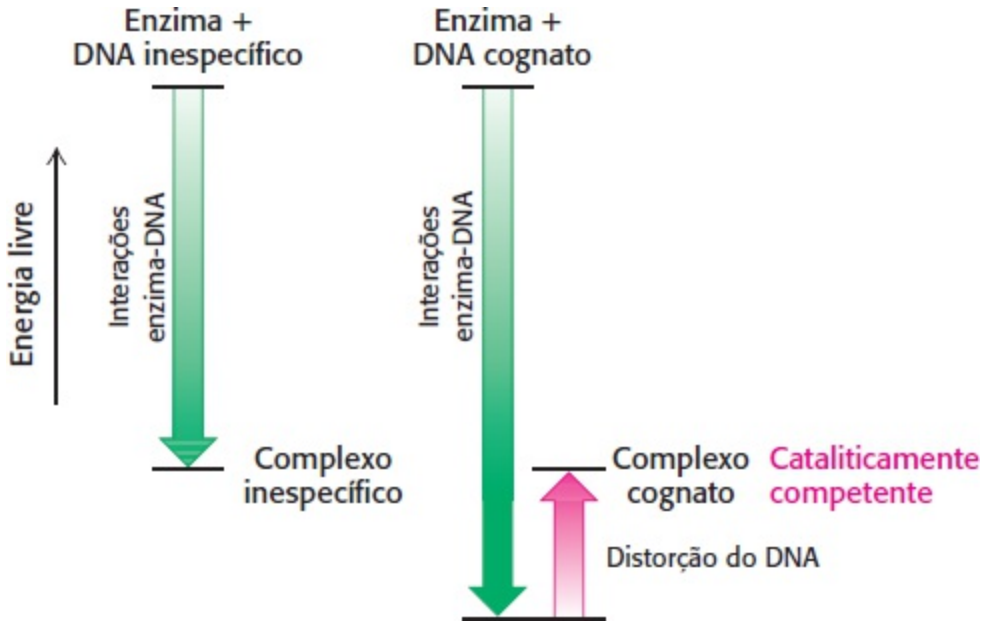


Figura 9.40 Maior energia de ligação da endonuclease *Eco*RV ligada ao DNA cognato *versus* DNA não cognato. As interações adicionais entre a endonuclease *Eco*RV e o DNA cognato aumentam a energia de ligação que pode ser utilizada para impulsionar as distorções do DNA necessárias para formar um complexo cataliticamente competente.

O DNA da célula hospedeira é protegido pela adição de grupos metila a bases específicas

Como uma célula hospedeira que abriga uma enzima de restrição protege seu próprio DNA? O DNA da célula hospedeira é metilado em bases de adenina específicas dentro das sequências de reconhecimento da célula hospedeira por outras enzimas, denominadas *metilases* (Figura 9.41). Uma endonuclease não clivará o DNA se a sua sequência de reconhecimento estiver metilada. Para cada endonuclease de restrição, a célula hospedeira produz uma metilase correspondente que marca o DNA da célula hospedeira no sítio de metilação apropriado. Esses pares de enzimas são designados como *sistemas de restrição-modificação*.

A distorção do DNA explica como a metilação bloqueia a catálise e protege o DNA da célula hospedeira. A *E. coli* hospedeira adiciona um grupo metila ao grupo amino do nucleotídio de adenina na extremidade 5′ da sequência de reconhecimento. A presença do grupo metila bloqueia a formação de uma ponte de hidrogênio entre o grupo amino e o grupo carbonila da cadeia lateral da asparagina 185 (Figura 9.42). Esse resíduo de asparagina está estreitamente ligado aos outros aminoácidos que formam contatos específicos com o DNA. A ausência da ponte de hidrogênio rompe outras interações entre a enzima e o DNA substrato, e não ocorre a distorção necessária para a clivagem.

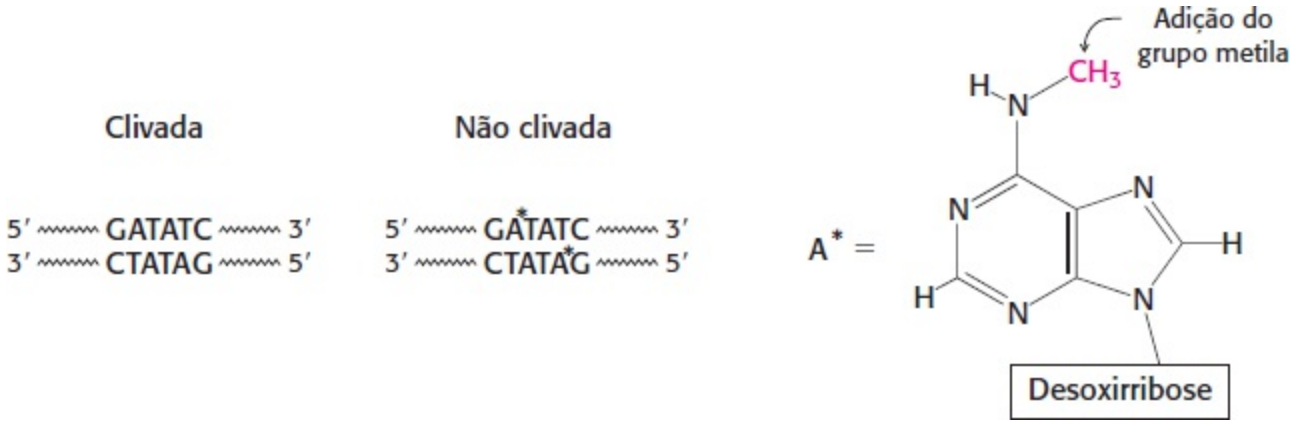


Figura 9.41 Proteção por metilação. A sequência de reconhecimento para a endonuclease *Eco*RV (à esquerda) e os sítios de metilação (à direita) no DNA protegido da ação catalítica da enzima.

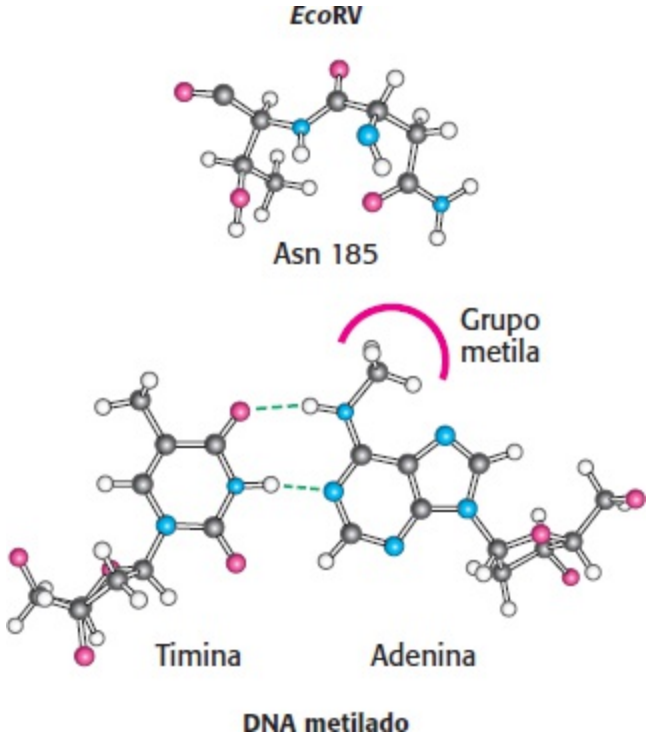


Figura 9.42 Metilação da adenina. A metilação da adenina bloqueia a formação de pontes de hidrogênio entre a endonuclease *Eco*RV e as moléculas de DNA cognato, impedindo a sua hidrólise.

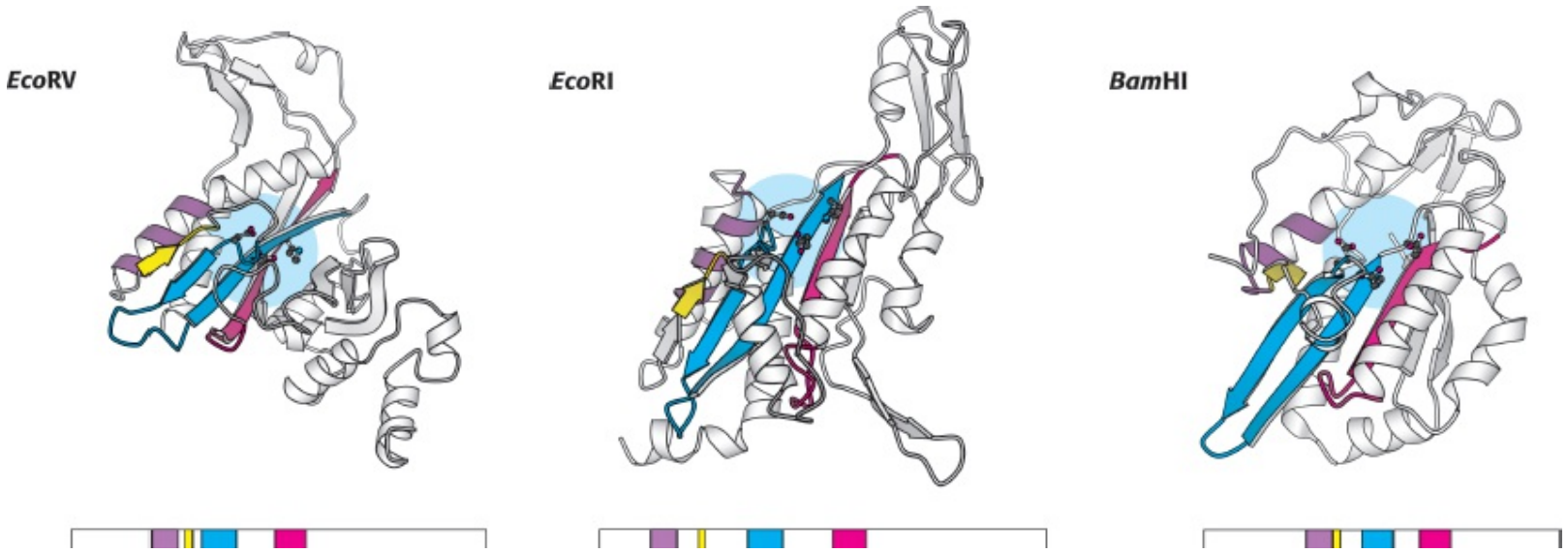


Figura 9.43 Um cerne estrutural conservado nas enzimas de restrição tipo II. Quatro elementos estruturais

conservados, incluindo a região do sítio ativo (em azul), são ressaltados em cores nesses modelos de um único monômero de cada enzima dimérica. Observe que esses elementos adotam estruturas semelhantes em cada enzima. As posições das sequências de aminoácidos que formam esses elementos dentro de cada sequência global estão representadas de modo esquemático abaixo de cada estrutura. [Desenhada a partir de 1RVB.pdb; 1ERI.pdb; 1BHM.pdb.]

As enzimas de restrição tipo II apresentam um cerne catalítico em comum e provavelmente estão relacionadas por transferência gênica horizontal

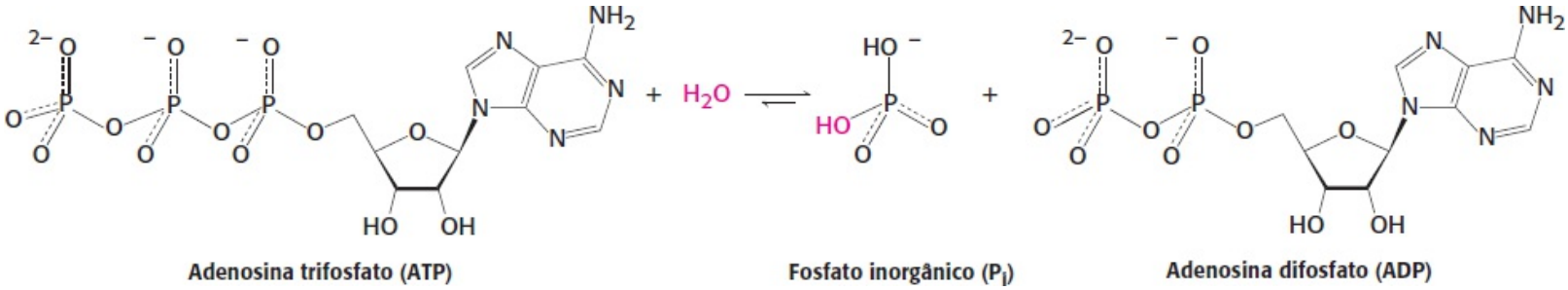
As enzimas de restrição tipo II são prevalentes nas *Archaea* e *Bacteria*. O que podemos dizer acerca da história evolutiva dessas enzimas? A comparação das sequências de aminoácidos de uma variedade de endonucleases de restrição tipo II não revelou nenhuma semelhança significativa de sequência entre a maioria dos pares de enzima. Entretanto, um exame cuidadoso das estruturas tridimensionais, levando em conta a localização dos sítios ativos, revelou a presença de uma estrutura central conservada nas diferentes enzimas. Essa estrutura inclui fitas β que contêm os resíduos de aspartato (ou, em alguns casos, de glutamato) que formam os sítios de ligação ao íon magnésio (Figura 9.43).

Essas observações indicam que muitas enzimas de restrição tipo II estão, de fato, evolutivamente relacionadas. As análises das sequências com maiores detalhes sugerem que as bactérias podem ter obtido genes que codificam essas enzimas a partir de outras espécies por *transferência gênica horizontal*, isto é, a passagem de segmentos do DNA (como os plasmídios) entre espécies, proporcionando uma vantagem seletiva em determinado ambiente. Por exemplo, a *Eco*RI (de *E. coli*) e a *Rsr*I (de *Rhodobacter sphaeroides*) exibem uma identidade de sequência de 50% em mais de 266 aminoácidos, indicando claramente uma estreita relação evolutiva. Entretanto, essas espécies de bactérias não estão estreitamente aparentadas; elas *parecem ter obtido o gene para essas endonucleases de restrição a partir de uma fonte comum depois da sua divergência evolutiva.* Além disso, os códons utilizados pelo gene que codifica a endonuclease *Eco*RI para especificar determinados aminoácidos são notavelmente diferentes daqueles usados pela maioria dos genes de *E. coli*, sugerindo que o gene não se originou na *E. coli*.

A transferência gênica horizontal pode constituir um exemplo comum. Por exemplo, os genes que inativam os antibióticos são frequentemente transferidos, levando à transmissão de resistência a antibióticos de uma espécie para outra. Para os sistemas de restrição-modificação, a proteção contra infecções virais pode ter favorecido a transferência gênica horizontal.

9.4 As miosinas aproveitam mudanças conformacionais das enzimas para acoplar a hidrólise do ATP ao trabalho mecânico

As últimas enzimas que consideraremos são as miosinas. Essas enzimas catalisam a hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) para formar adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (P_i) e utilizam a energia associada a essa reação termodinamicamente favorável para impulsionar o movimento das moléculas dentro das células.



Por exemplo, quando levantamos um livro, a energia necessária provém da hidrólise de ATP catalisada pela miosina em nossos músculos. As miosinas são encontradas em todos os eucariotos, e o genoma humano codifica mais de 40 miosinas diferentes. Em geral, as miosinas apresentam estruturas alongadas com domínios globulares que, na realidade, efetuam a hidrólise de ATP (Figura 9.44). Neste capítulo, consideraremos os domínios de ATPase globulares, particularmente as estratégias empregadas pelas miosinas para hidrolisar ATP de modo controlado e usar a energia livre associada a essa reação para promover mudanças substanciais de conformação dentro da molécula de miosina. Essas mudanças conformacionais são amplificadas por outras estruturas nas moléculas alongadas de miosina para transportar proteínas ou outras cargas a distâncias consideráveis dentro das células. No Capítulo 35, examinaremos mais detalhadamente a ação das miosinas e de outras proteínas motoras moleculares.

Conforme discutido no Capítulo 15, o ATP é usado como principal forma de energia no interior das células. Muitas enzimas utilizam a hidrólise do ATP para impulsionar outras reações e processos. Em quase todos os casos, uma enzima que tenha hidrolisado o ATP sem qualquer processo acoplado desse tipo simplesmente irá drenar as reservas de energia de uma célula sem qualquer benefício.

Figura 9.44 Estrutura alongada da miosina do músculo. Micrografia eletrônica mostrando a miosina do músculo de mamífero. Essa proteína dimérica apresenta uma estrutura alongada, com dois domínios de ATPase globulares por dímero. [Cortesia de Dra. Paula Flicker, Dr. Theo Walliman e Dr. Peter Vibert.]

A hidrólise do ATP ocorre pelo ataque do grupo gama fosforila pela água

Ao examinarmos o mecanismo das enzimas de restrição, aprendemos que uma molécula de água ativada efetua o ataque nucleofílico do fósforo, clivando o arcabouço de fosfodiéster do DNA. A clivagem do ATP pelas miosinas segue um mecanismo análogo. Para entender mais detalhadamente os mecanismos das miosinas, precisamos examinar em primeiro lugar a estrutura do domínio de *ATPase* da miosina.

Foram examinadas as estruturas dos domínios de ATPase de várias miosinas diferentes. Um domínio desse tipo, o da ameba do solo *Dictyostelium discoideum*, um organismo que tem sido muito útil para o estudo do movimento celular e das proteínas motoras moleculares, foi estudado pormenorizadamente. A estrutura cristalográfica desse fragmento proteico na ausência de nucleotídios revelou um único domínio globular constituído por aproximadamente 750 aminoácidos. Existe uma bolsa repleta de água próximo ao centro da estrutura, sugerindo um possível sítio de ligação de nucleotídios. Cristais dessa proteína foram colocados em soluções contendo ATP, e a estrutura foi novamente examinada. Essa estrutura revelou notavelmente a ligação de ATP intacto ao sítio ativo, com pouca modificação da estrutura global e sem qualquer evidência de hidrólise significativa (Figura 9.45). O ATP também está ligado a um íon Mg^{2+}.

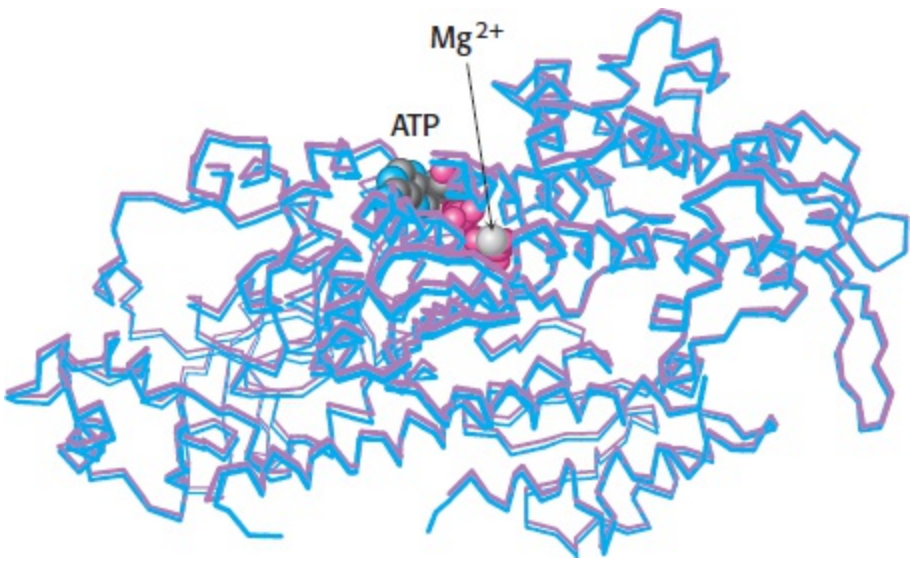


Figura 9.45 Estrutura do complexo miosina-ATP. Sobreposição das estruturas do domínio de ATPase da miosina de *Dictyostelium discoideum*, sem ligantes ligados (em azul) e do complexo dessa proteína com ATP e magnésio ligados (vermelho). *Observe* que as duas estruturas são extremamente semelhantes entre si. [Desenhada a partir de FMV.pdb e 1FMW.pdb].

Estudos cinéticos das miosinas, bem como de muitas outras enzimas cujo substrato é o ATP ou outro nucleosídio trifosfato como substrato, revelam que essas enzimas são essencialmente inativas na ausência de íons metálicos divalentes, como o magnésio (Mg^{2+}) ou o manganês (Mn^{2+}), mas que adquirem atividade com a adição desses íons. Diferentemente das enzimas discutidas até o momento, o metal não constitui um componente do sítio ativo. Na verdade, nucleotídios, como o ATP, ligam-se a esses íons, e o complexo íon metálico-nucleotídio constitui o verdadeiro substrato das enzimas. A constante de dissociação para o complexo ATP–Mg^{2+} é de cerca de 0,1 mM e, tendo em vista que, as concentrações intracelulares de Mg^{2+} tipicamente se situam na faixa de milimolar, praticamente todos os nucleosídios trifosfato estão presentes na forma de complexos NTP–Mg^{2+}. *Os complexos de magnésio ou manganês com nucleosídios trifosfato constituem os verdadeiros substratos de*

praticamente todas as enzimas dependentes de NTP.

O ataque nucleofílico do grupo γ-fosforila por uma molécula de água necessita de algum mecanismo como o resíduo básico ou um íon metálico ligado, para ativar a água. O exame da estrutura do complexo miosina-ATP mostra que não existe nenhum resíduo básico em posição apropriada e revela que o íon Mg^{2+} ligado está muito distante do grupo fosforila para desempenhar esse papel. Essas observações sugerem que esse complexo de ATP é relativamente estável; a enzima não se encontra em uma conformação que seja competente para catalisar a reação, o que indica que o domínio precisa sofrer mudança conformacional para catalisar a reação de hidrólise do ATP.

A formação do estado de transição para a hidrólise do ATP está associada a mudança substancial de conformação

A conformação cataliticamente competente do domínio de ATPase da miosina precisa se ligar e estabilizar o estado de transição da reação. Em analogia com as enzimas de restrição, espera-se que a hidrólise do ATP inclua um estado de transição pentacoordenado.

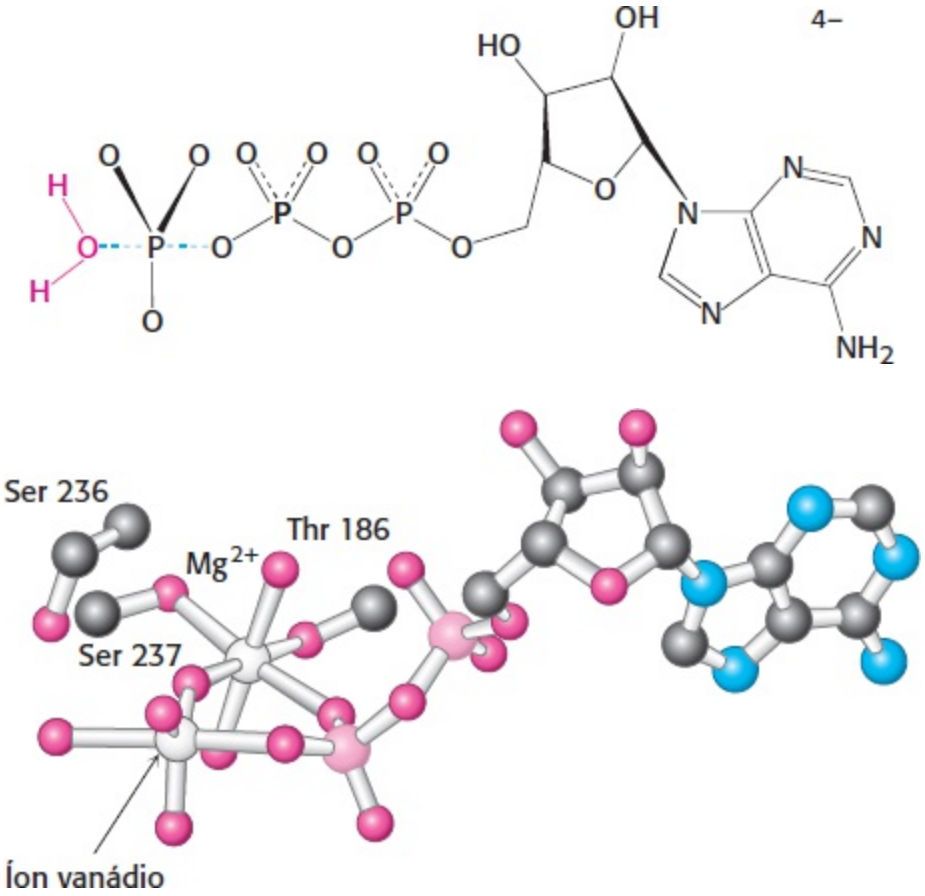


Figura 9.46 Análogo do estado de transição da ATPase da miosina. Estrutura do análogo do estado de transição formado pelo tratamento do domínio de ATPase da miosina com ATP e vanadato (VO_4^{3-}), na presença de magnésio. Observe que o íon vanádio está coordenado a cinco átomos de oxigênio, incluindo um do ADP. São mostradas as posições de dois resíduos que se ligam ao magnésio, bem como a Ser 236, um resíduo que parece desempenhar um papel direto na catálise. [Desenhada a partir de 1VOM.pdb]

Essas estruturas pentacoordenadas baseadas no fósforo são muito instáveis e, por isso, não podem ser facilmente observadas. Entretanto, análogos do estado de transição, nos quais o fósforo é substituído por outros átomos, são mais estáveis. O metal de transição, o vanádio, em particular, forma estruturas semelhantes. O domínio de ATPase da miosina foi cristalizado na presença de ADP

e vanadato VO_4^{3-}. O resultado foi a formação de um complexo que corresponde estreitamente à estrutura esperada do estado de transição (Figura 9.46). Conforme esperado, o átomo de vanádio é coordenado a cinco átomos de oxigênio, incluindo um átomo de oxigênio do ADP diametralmente oposto a um átomo de oxigênio que é análogo à molécula de água de ataque no estado de transição. O íon Mg^{2+} é coordenado a um átomo de oxigênio do vanadato, a um átomo de oxigênio do ADP, a dois grupos hidroxila da enzima e a duas moléculas de água. Nessa posição, esse íon não parece desempenhar um papel direto na ativação da água que ataca. Entretanto, um resíduo adicional da enzima, a Ser 236, está bem posicionado para participar da catálise (Figura 9.46). No mecanismo proposto de hidrólise do ATP fundamentado nessa estrutura, a molécula de água ataca o grupo γ-fosforila, com o grupo hidroxila da Ser 236 facilitando a transferência de um próton da água que ataca para o grupo hidroxila da Ser 236 que, por sua vez, é desprotonada por um dos átomos de oxigênio do grupo γ-fosforila (Figura 9.47). *Por conseguinte, o ATP atua, de fato, como base para promover a sua própria hidrólise.*

A comparação das estruturas globais do domínio de ATPase da miosina complexado com ATP e com ADP-vanadato revela algumas diferenças notáveis. Alguns resíduos movem-se ligeiramente em torno do sítio ativo. Especificamente, um segmento de aminoácido move-se em direção ao nucleotídio em aproximadamente 2 Å e interage com o átomo de oxigênio que corresponde à molécula de água de ataque. Essas mudanças ajudam a facilitar a reação de hidrólise ao estabilizarem o estado de transição. Entretanto, o exame da estrutura global mostra a ocorrência de alterações ainda mais marcantes.

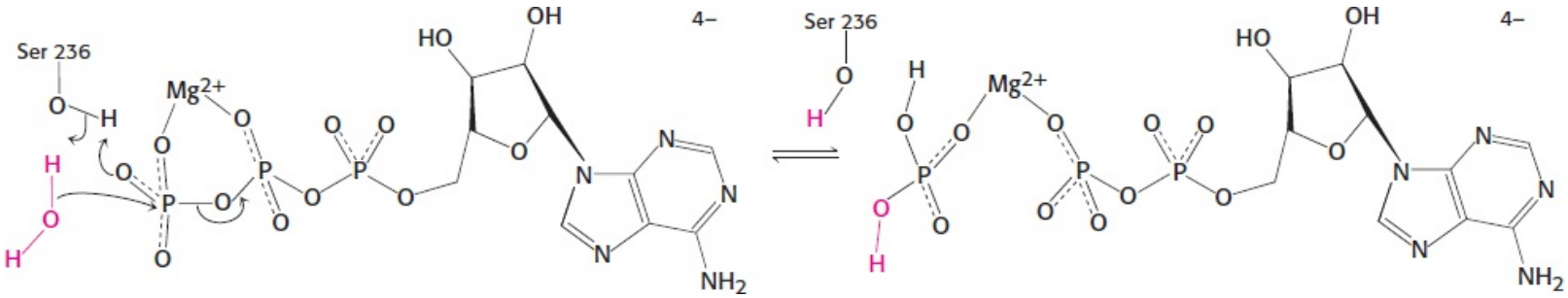


Figura 9.47 Facilitação o ataque pela água. A molécula de água que ataca o grupo γ-fosforila do ATP é desprotonada pelo grupo hidroxila da Ser 236 que, por sua vez, é desprotonada por um dos átomos de oxigênio do grupo γ-fosforila, formando o produto $H_2PO_4^-$.

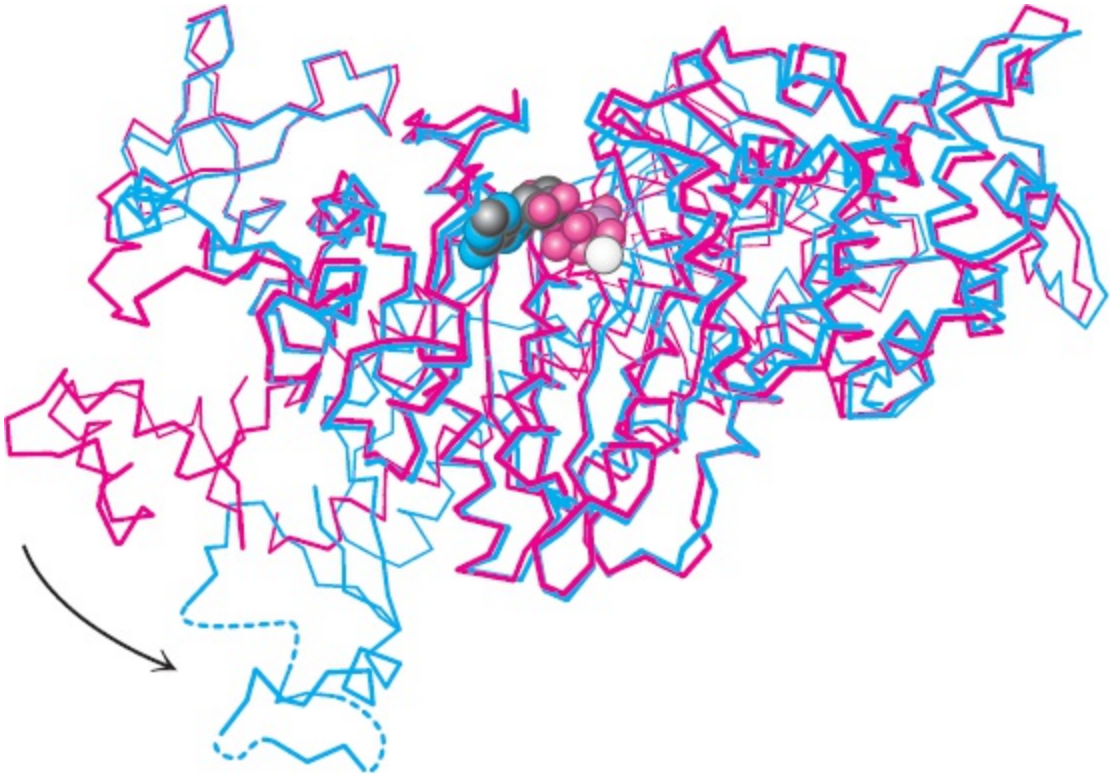
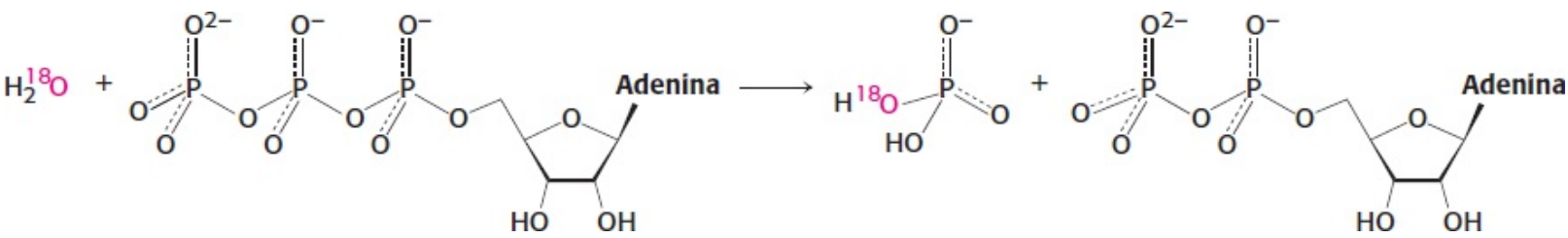


Figura 9.48 Mudanças conformacionais da miosina. Comparação das estruturas globais do domínio de ATPase da miosina com ATP ligado (mostrado em vermelho) com o análogo do estado de transição ADP-vanadato (mostrado em azul). Observe a grande mudança conformacional de uma região na extremidade carboxiterminal do domínio, da qual algumas partes se movem até 25 Å. [Desenhada a partir de 1FMW.pdb e 1VOM.pdb]

Uma região constituída de aproximadamente 60 aminoácidos na extremidade carboxiterminal do domínio adota uma configuração diferente do complexo de ADP-vanadato, deslocado por uma distância de até 25 Å de sua posição no complexo de ATP (Figura 9.48). Esse deslocamento amplifica enormemente as alterações relativamente sutis que ocorrem no sítio ativo. O efeito desse movimento é ainda mais amplificado quando esse domínio carboxiterminal é conectado a outras estruturas dentro das estruturas alongadas típicas das moléculas de miosina (Figura 9.44). Por conseguinte, a conformação que é capaz de promover a reação de hidrólise do ATP difere substancialmente de outras mudanças conformacionais que ocorrem durante o ciclo de catálise.

A conformação alterada da miosina persiste por um longo período de tempo

As miosinas são enzimas lentas, e a sua renovação ocorre, tipicamente, cerca de uma vez por segundo. Que etapas limitam a velocidade de renovação? Em um experimento que foi particularmente revelador, a hidrólise do ATP foi catalisada pelo domínio de ATPase de miosina do músculo de mamífero. A reação ocorreu em água marcada com ^{18}O para acompanhar a incorporação do solvente oxigênio nos produtos da reação. A fração de oxigênio no produto de fosfato foi analisada. No caso mais simples, o esperado é que o fosfato tivesse um átomo de oxigênio derivado da água e três inicialmente presentes no grupo fosforila terminal do ATP.



Em lugar disso, foram encontrados, em média, entre dois e três átomos de oxigênio no fosfato provenientes da água. Essas observações indicam que a reação de hidrólise do ATP dentro do sítio ativo da enzima é reversível. Cada molécula de ATP é clivada em ADP e P_i e, a seguir, é novamente formada a partir desses produtos várias vezes antes de os produtos serem liberados da enzima (Figura 9.49). À primeira vista, essa observação é surpreendente, visto que a hidrólise ao ATP é uma reação muito favorável, com uma constante de equilíbrio de cerca de 140.000. Entretanto, essa constante de equilíbrio aplica-se às moléculas livres em solução, e não dentro do sítio ativo de uma enzima. Com efeito, uma análise mais pormenorizada sugere que essa constante de equilíbrio na enzima é de aproximadamente 10, iniciando uma estratégia geral utilizada pelas enzimas. As enzimas catalisam reações ao estabilizarem o estado de transição. A estrutura desse estágio de transição é intermediária entre os reagentes ligados à enzima e os produtos ligados à enzima. Muitas das interações que estabilizam o estado de transição ajudam a igualar as estabilidades dos reagentes e dos produtos. Por conseguinte, *a constante de equilíbrio entre os reagentes ligados à enzima e os produtos geralmente se aproxima de 1, independentemente da constante de equilíbrio para os reagentes e produtos livres em solução.*

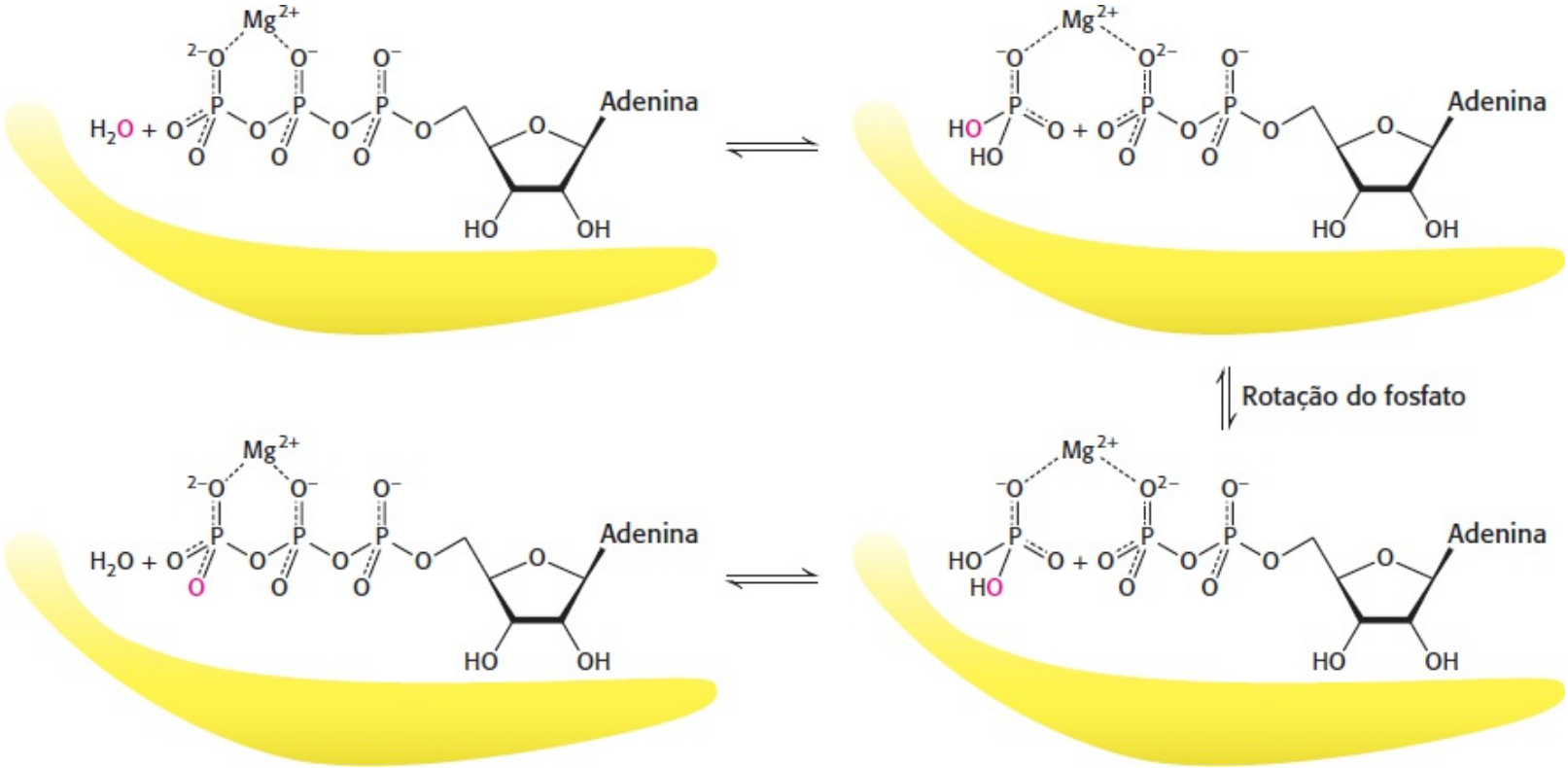


Figura 9.49 Hidrólise reversível do ATP dentro do sítio ativo da miosina. Para a miosina, mais de um átomo de oxigênio da água é incorporado no fosfato inorgânico. Os átomos de oxigênio são incorporados em ciclos de hidrólise do ATP a ADP e fosfato inorgânico, rotação do fosfato dentro do sítio ativo e nova formação de ATP contendo agora oxigênio proveniente da água.

Essas observações revelam que a hidrólise do ATP em ADP e P_i não é uma etapa limitante para a

velocidade da reação catalisada pela miosina. Na verdade, a liberação dos produtos, em particular P_i, da enzima é limitante da velocidade. A constatação de que uma conformação da miosina com ATP hidrolisado, porém ainda ligado à enzima, persiste por um período significativo de tempo é essencial para o acoplamento das alterações conformacionais que ocorrem durante a reação com outros processos.

As miosinas são uma família de enzimas que contêm estruturas de alças P

A cristalografia de raios X forneceu as estruturas tridimensionais de várias enzimas diferentes que compartilham características estruturaischave, quase certamente, uma história evolutiva com a miosina. Em particular, existe um domínio de cerne de ligação de NTP conservado, que consiste em uma folha β central, circundada, em ambos os lados, por α-hélices (Figura 9.50). Uma característica desse domínio é a presença de um laço entre a primeira fita β e a primeira hélice. Tipicamente, esse laço apresenta vários resíduos de glicina, que frequentemente são conservados entre membros mais estreitamente relacionados dessa família grande e diversificada. Essa alça é frequentemente designada como *alço-P* (*P-loop*), visto que ela interage com grupos fosforila no nucleotídio ligado. Existem domínios de NTPase com alços-P em uma grande variedade de proteínas, muitas das quais participam de processos bioquímico essenciais. Entre elas destacam-se a ATP sintase, a enzima-chave responsável pela produção de ATP; proteínas de transdução de sinais, como as proteínas G; proteínas essenciais para a tradução do mRNA em proteínas, como o fator de alongamento Tu; e helicases de desenrolamento do DNA e RNA. A ampla utilidade dos domínios de NTPases com alço-P é talvez mais bem explicada pela sua capacidade de sofrer mudanças conformacionais substanciais com a ligação de nucleosídio trifosfato e hidrólise. Encontraremos esses domínios em todos os capítulos deste livro e observaremos como eles funcionam como molas, motores e relógios. Para facilitar o reconhecimento desses domínios no livro, eles serão representados com as superfícies internas das fitas em um diagrama de fitas em cor violeta, com o alço-P em verde (Figura 9.51).

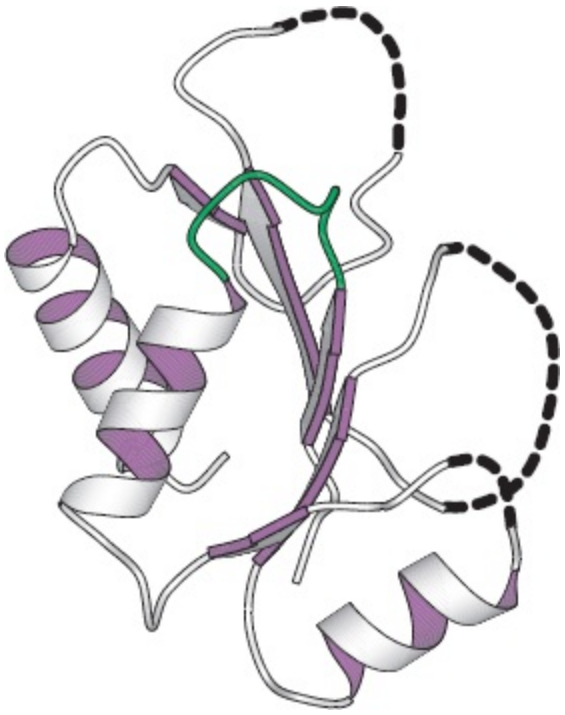


Figura 9.50 O domínio de cerne das NMP quinases. *Observe* a alço-P mostrado em verde. As linhas tracejadas representam a parte restante da estrutura da proteína. [Desenhada a partir de 1GKY.pdb.]

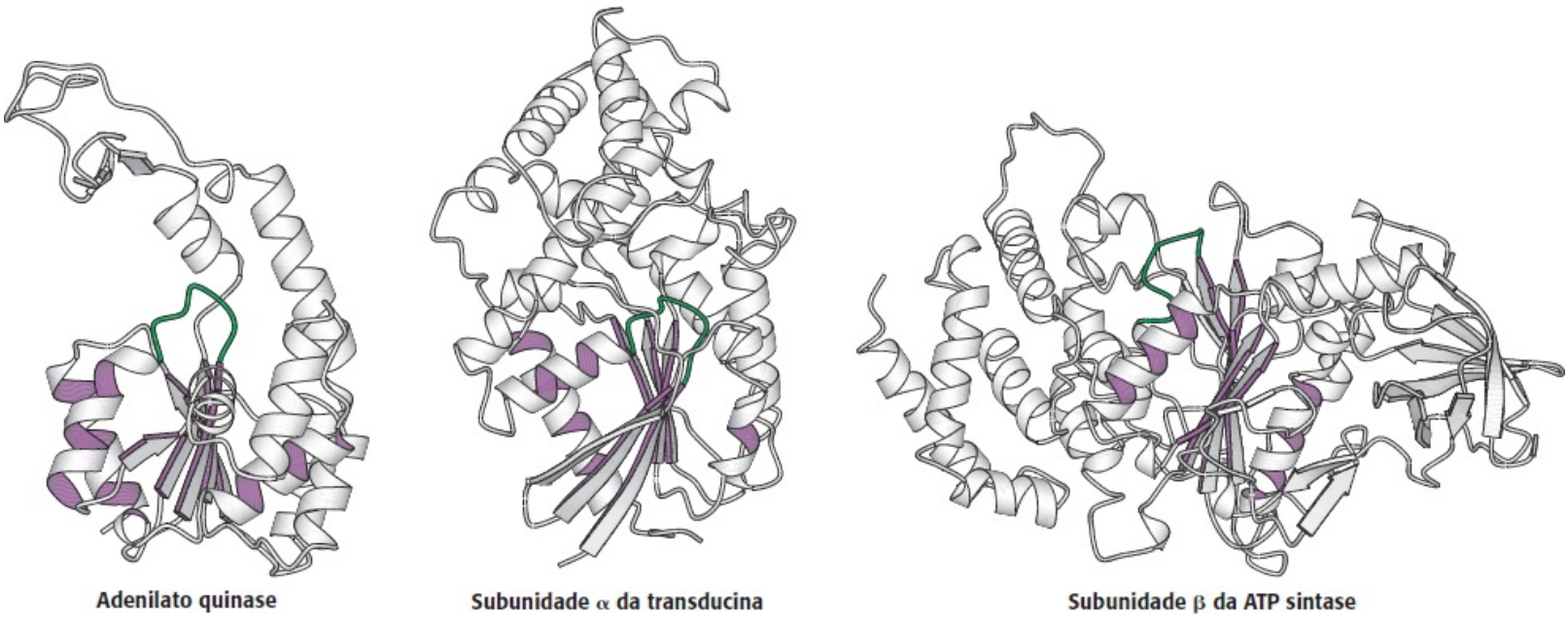


Figura 9.51 Três proteínas contendo domínios de NTPases com alços-P. *Observe* os domínios conservados mostrados com as superfícies internas das fitas em violeta e alços-P em verde. [Desenhada a partir de 4AKE.pdb; 1TND.pdb; 1BNF.pdb.]

Resumo

As enzimas adotam conformações que são estrutural e quimicamente complementares aos estados de transição das reações que elas catalisam. Conjuntos de resíduos de aminoácidos que interagem formam sítios com as propriedades estruturais e químicas especiais, necessárias para estabilizar o estado de transição. As enzimas utilizam cinco estratégias básicas para formar e estabilizar o estado de transição: (1) uso da energia de ligação, (2) catálise covalente, (3) catálise ácido-base geral, (4) catálise por íons metálicos e (5) catálise por aproximação. As quatro classes de enzimas examinadas neste capítulo catalisam a adição de água a seus substratos, porém têm diferentes necessidades de velocidade catalítica, especificidade e acoplamento a outros processos.

9.1 As proteases facilitam uma reação fundamentalmente difícil

A clivagem de ligações peptídicas pela quimiotripsina é iniciada pelo ataque de um resíduo de serina no grupo carbonila do peptídio. O grupo hidroxila atacante é ativado pela sua interação com o grupo imidazol de um resíduo de histidina que, por sua vez, está ligado a um resíduo de aspartato. Essa tríade catalítica Ser-His-Asp gera um poderoso nucleófilo. O produto dessa reação inicial é o intermediário covalente formado pela enzima e por um grupo acila derivado do substrato ligado. A hidrólise desse intermediário acil-enzima completa o processo de clivagem. Os intermediários tetraédricos dessas reações apresentam uma carga negativa no átomo de oxigênio carbonílico do peptídio, que é estabilizada por interações com grupos NH dos peptídios em uma região da enzima denominada cavidade do oxiânion.

Outras proteases empregam a mesma estratégia de catálise. Algumas dessas proteases, como a tripsina e elastase, são homólogas da quimiotripsina. Outras proteases, como a subtilisina,

contêm uma tríade catalítica muito semelhante que surgiu por evolução convergente. Em várias outras classes de proteases, existem estruturas de sítios ativos que diferem da tríade catalítica. Essas classes empregam uma variedade de estratégias de catálise; todavia, em cada caso, ocorre produção de um nucleófilo que é suficientemente poderoso para atacar o grupo carbonila do peptídio. Em algumas enzimas, o nucleófilo deriva de uma cadeia lateral e, em outras, uma molécula de água ativa ataca diretamente a carbonila do peptídio.

9.2 As anidrases carbônicas aceleram uma reação rápida

As anidrases carbônicas catalisam a reação da água com dióxido de carbono, produzindo ácido carbônico. A catálise pode ser extremamente rápida: algumas anidrases carbônicas hidratam o dióxido de carbono em velocidades de até 1 milhão de vezes por segundo. Um íon zinco firmemente ligado constitui um componente crucial dos sítios ativos dessas enzimas. Cada íon zinco liga-se a uma molécula de água que promove a sua desprotonação, produzindo um íon hidróxido em pH neutro. Esse íon hidróxido ataca o dióxido de carbono, formando o íon bicarbonato HCO_3^-. Devido aos papéis fisiológicos do dióxido de carbono e dos íons bicarbonato, a velocidade constitui a essência dessa enzima. Para sobrepujar as limitações impostas pela taxa de transferência de prótons da molécula de água ligada ao zinco, as anidrase carbônicas mais ativas desenvolveram uma lançadeira de prótons para transferi-los a um tampão.

9.3 As enzimas de restrição catalisam reações de clivagem do DNA altamente específicas

Um alto nível de especificidade de substrato constitui frequentemente o elemento essencial para a função biológica. As endonucleases de restrição que clivam o DNA em sequências de reconhecimento específicas discriminam as moléculas que contêm essas sequências de reconhecimento daquelas que não as contêm. Dentro do complexo enzima-substrato, o DNA substrato é distorcido de modo a criar um sítio de ligação de íons magnésio entre a enzima e o DNA. O íon magnésio liga-se a uma molécula de água e a ativa, e esta ataca o arcabouço fosfodiéster.

Algumas enzimas discriminam substratos potenciais, ligando-se a eles com diferentes afinidades. Outras podem ligar-se a muitos substratos potenciais, porém só promovem reações químicas de modo eficiente em moléculas específicas. Algumas endonucleases de restrição, como a endonuclease *Eco*RV, empregam este último mecanismo. Apenas as moléculas que contêm a sequência de reconhecimento apropriada são distorcidas de modo a possibilitar a ligação de íons magnésio e, portanto, a catálise. As enzimas de restrição são impedidas de atuar sobre o DNA de uma célula hospedeira pela metilação dos sítios-chave dentro de suas sequências de reconhecimento. Os grupos metila adicionados bloqueiam interações específicas entre as enzimas e o DNA, de modo que não ocorra a distorção necessária para a clivagem.

9.4 As miosinas aproveitam mudanças conformacionais das enzimas para acoplar a hidrólise do ATP ao trabalho mecânico

Por fim, as miosinas catalisam a hidrólise da adenosina trifosfato (ATP), formando adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (P_i). As conformações dos domínios de ATPase da miosina sem nucleotídios ligados e com ATP ligado são muito semelhantes. Com o uso de ADP e vanadato (VO_4^{3-}), pode-se criar uma excelente reprodução do estado de transição da hidrólise do

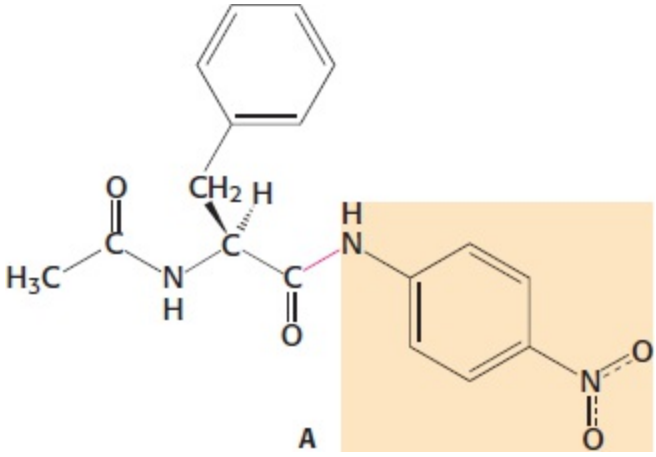
ATP ligada ao domínio de ATPase da miosina. A estrutura desse complexo revela a ocorrência de mudanças conformacionais drásticas com a produção dessa espécie a partir do complexo de ATP. Essas mudanças conformacionais são utilizadas para acionar movimentos substanciais nos motores moleculares. A velocidade de hidrólise do ATP pela miosina é relativamente baixa e limitada pela taxa de liberação do produto a partir da enzima. A hidrólise do ATP a ADP e P_i dentro da enzima é reversível, com uma constante de equilíbrio de cerca de 10, em comparação com uma constante de equilíbrio de 140.000 para as espécies livres em solução. As miosinas fornecem exemplos de enzimas NTPases com alços-P, que abrangem um grande conjunto de famílias de proteínas que desempenham papéis essenciais em uma variedade de processos biológicos, em virtude das mudanças conformacionais que elas sofrem com vários nucleotídios ligados.

Palavras-chave

alça P (p. 286)
ATPase (p. 281)
catálise ácido-base geral (p. 256)
catálise covalente (p. 256)
catálise por aproximação (p. 256)
catálise por íons metálicos (p. 256)
cavidade de oxiânion (p. 260)
deslocamento em linha (p. 275)
encaixe induzido (p. 256)
energia de ligação (p. 256)
inibidor da protease (p. 266)
lançadeira de prótons (p. 272)
metilases (p. 279)
reação de modificação química (p. 258)
sequência de reconhecimento (p. 274)
sistema de restrição-modificação (p. 279)
transferência gênica horizontal (p. 280)
tríade catalítica (p. 260)

Questões

1. *Sem surto*. O exame da clivagem do substrato amida A pela quimiotripsina com o uso de métodos de cinética de fluxo interrompido não revelou nenhum surto. A reação é monitorada pela observação da cor produzida com a liberação da porção amino do substrato (destacada em laranja). Por que não foi observado nenhum surto?



2. *Contribuindo para a sua própria extinção.* Considere os substratos A e B da subtilisina.

Phe-Ala-Gln-Phe-X

A

Phe-Ala-His-Phe-X

B

Esses substratos são clivados (entre Phe e X) pela subtilisina nativa com essencialmente a mesma velocidade. Todavia, o mutante His 64 para Ala da subtilisina cliva o substrato B com uma velocidade mais de 1.000 vezes superior àquela com que cliva o substrato A. Proponha uma explicação.

3. *1 + 1 ≠ 2.* Considere o seguinte argumento. Na subtilisina, a mutação da Ser 221 para Ala resulta em uma redução da atividade de 10^6 vezes. A mutação da His 64 para Ala resulta em uma diminuição semelhante de 10^6 vezes. Consequentemente, a mutação simultânea de Ser 221 para Ala e da His 64 para Ala deve resultar em uma redução da atividade de $10^6 = 10^{12}$ vezes. Essa redução é correta? Por que sim ou por que não?

4. *Adicionando uma carga*. Na quimiotripsina, foi produzido um mutante com a Ser 189, que está no fundo da bolsa de especificidade do substrato, substituída por Asp. Que efeito você pode prever para essa mutação Ser 189 → Asp 189?

5. *Resultados condicionais*. Na anidrase carbônica II, esperava-se que a mutação do resíduo His 64 da lançadeira de prótons para Ala resultasse em uma redução da velocidade máxima de catálise. Todavia, em tampões como o imidazol, com componentes moleculares relativamente pequenos, não foi observada nenhuma redução de velocidade. Em tampões com componentes moleculares maiores, foi constatada uma redução significativa de velocidade. Proponha uma explicação.

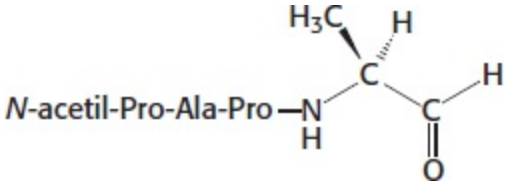
6. *Quantos sítios?* Um pesquisador isolou uma endonuclease de restrição que só cliva em determinado sítio de dez pares de bases. Essa enzima seria útil para proteger células contra infecções virais, tendo em vista que um genoma viral típico tem 50.000 pares de bases de comprimento? Explique.

7. *Mais rápido significa melhor?* Em geral, as endonucleases de restrição são enzimas bastante lentas, com valores típicos de renovação de 1 s^{-1}. Suponha que as endonucleases fossem mais rápidas, com valores de renovação semelhantes aos da anidrase carbônica (10^6 s^{-1}). Essa taxa aumentada seria benéfica para as células hospedeiras, supondo que as enzimas rápidas tenham níveis semelhantes de especificidade?

8. *Adotando um novo gene.* Suponha que uma espécie de bactéria obtivesse por transferência gênica horizontal um gene que codificasse uma endonuclease de restrição. Você acredita que essa aquisição seria benéfica?

9. *Tratamento com quelação*. O tratamento da anidrase carbônica com altas concentrações do quelante de metais EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) resulta em perda da atividade enzimática. Proponha uma explicação.

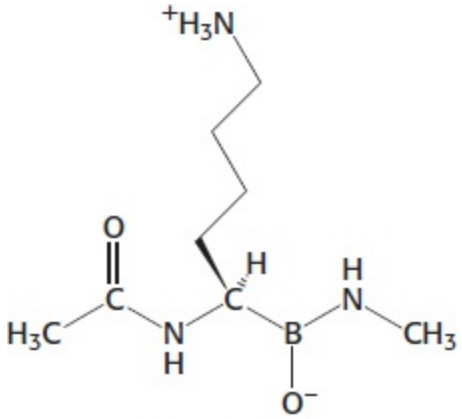
10. *Um aldeído inibidor*. A elastase é especificamente inibida por um derivado aldeídico de um de seus substratos:



(a) Qual o resíduo no sítio ativo da elastase que tem mais tendência a formar uma ligação covalente com esse aldeído?

(b) Que tipo de ligação covalente deve ser formada?

11. *Identifique a enzima*. Considere a estrutura da molécula A. Qual das enzimas discutidas nesse capítulo você acredita que seja mais efetivamente inibida pela molécula A?



Molécula A

12. *Teste ácido.* Em pH 7,0, a anidrase carbônica apresenta um valor de k_{cat} 600.000 s^{-1}. Estime o valor esperado de k_{cat} em pH de 6,0.

13. *Restrição*. Para interromper uma reação em que uma enzima de restrição cliva o DNA, os pesquisadores frequentemente acrescentam altas concentrações do quelante de metais, o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). Por que a adição de EDTA interrompe a reação?

14. *Estratégia de marcação*. Acrescenta-se ATP ao domínio de ATPase da miosina em água marcada com ^{18}O. Após a hidrólise de 50% do ATP, o ATP remanescente é isolado, e verifica-se que ele contém ^{18}O. Explique.

15. *Viva a resistência*. Muitos pacientes tornam-se resistentes aos inibidores da protease do HIV com o passar do tempo, devido à ocorrência de mutações no gene do HIV que codifica a protease. Não

são encontradas mutações no resíduo de aspartato que interage com os fármacos. Por quê?

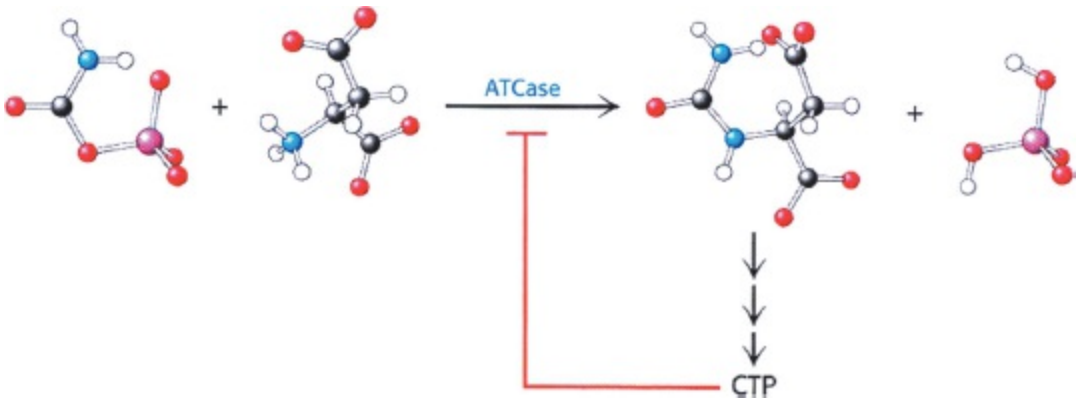
16. *Mais de uma maneira de descascar* k_{cat}. A serina 236 na miosina de *Dictyostelium discoideum* sofreu mutação para alanina. A proteína mutante apresentou uma redução modesta da atividade da ATPase. A análise da estrutura cristalográfica da proteína mutante revelou que uma molécula de água ocupava a posição do grupo hidroxila do resíduo de serina na proteína do tipo selvagem. Proponha um mecanismo para a atividade de ATPase da enzima mutante.

Questão sobre mecanismo

17. *Complete o mecanismo*. Com base na informação fornecida na Figura 9.17, complete os mecanismos de clivagem na ligação peptídica por (a) uma cisteína protease, (b) uma aspartil protease e (c) uma metaloprotease.

Estratégias de Regulação

10



À semelhança do tráfego de veículos, as vias metabólicas fluem mais eficientemente quando reguladas por sinais. A citidina trifosfato (CTP), o produto final de uma via de múltiplas etapas, controla o fluxo através da via ao inibir a etapa comprometida (etapa reguladora) catalisada pela aspartato transcarbamilase (ATCase). [Fotografia de Michael Winokur/Getty Images.]

SUMÁRIO

10.1 A aspartato transcarbamilase é inibida alostericamente pelo produto final da sua via

10.2 As isozimas fornecem um meio de regulação específica para diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento

10.3 A modificação covalente constitui um meio de regular a atividade enzimática

10.4 Muitas enzimas são ativadas por clivagem proteolítica específica

A atividade das enzimas frequentemente precisa ser regulada, de modo que possam funcionar no momento e local adequados. Essa regulação é essencial para a coordenação da imensa variedade de processos bioquímicos que ocorrem a todo instante em determinado organismo. A atividade enzimática é regulada de cinco principais maneiras:

1. *Controle alostérico.* As proteínas alostéricas contêm sítios regulatórios distintos e múltiplos sítios funcionais. A ligação de moléculas sinalizadoras pequenas aos sítios regulatórios constitui uma maneira significativa de controlar a atividade dessas proteínas. Além disso, as proteínas alostéricas têm a propriedade de *cooperatividade:* a atividade em um sítio funcional afeta a atividade em outros. As proteínas que exibem controle alostérico são, portanto, transdutoras de informação: a sua atividade pode ser modificada em resposta a moléculas sinalizadoras ou à informação compartilhada entre os sítios ativos. Neste capítulo examinaremos uma das proteínas alostéricas mais bem conhecidas: a enzima *aspartato transcarbamilase* (ATCase). A catálise pela aspartato transcarbamilase na primeira etapa da biossíntese de pirimidinas é inibida pela citidina trifosfato, o produto final da biossíntese, em um exemplo de *inibição por retroalimentação.* Já examinamos uma proteína alostérica – a hemoglobina, a proteína transportadora de oxigênio no sangue (Capítulo 7).

2. *Múltiplas formas de enzimas.* As isoenzimas ou isozimas proporcionam uma maneira de variar a regulação da mesma reação em locais ou tempos distintos para atender às necessidades fisiológicas específicas de determinado tecido em um momento específico. As isoenzimas são enzimas homólogas dentro de um mesmo organismo, que catalisam a mesma reação, mas que diferem levemente na sua estrutura e, mais obviamente, nos valores de K_M e $V_{máx.}$, bem como nas suas propriedades de regulação. Com frequência, as isoenzimas são expressas em tecidos ou organelas diferentes, ou em um estágio diferente do desenvolvimento.

3. *Modificação covalente reversível.* As propriedades catalíticas de muitas enzimas são acentuadamente alteradas pela ligação covalente de um grupo modificador, mais comumente um grupo fosforila. O ATP atua como doador de fosforila nessas reações, que são catalisadas por *proteínas quinases.* A remoção de grupos fosforila por hidrólise é catalisada por *proteína fosfatases.* Este capítulo analisa a estrutura, a especificidade e o controle da *proteína quinase A* (PKA), uma enzima eucariótica ubíqua que regula diversas proteínas-alvo.

4. *Ativação proteolítica.* As enzimas controladas por alguns desses mecanismos regulatórios alternam-se entre estados ativo e inativo. Uma estratégia de regulação diferente é utilizada para converter *irreversivelmente* uma enzima inativa em uma ativa. Muitas enzimas são ativadas pela hidrólise de algumas ou até mesmo de uma única ligação peptídica presente em precursores inativos, denominados *zimogênios* ou *proenzimas.* Esse mecanismo de regulação gera enzimas digestivas, como a quimiotripsina, a tripsina e a pepsina. A coagulação do sangue resulta de uma notável cascata de ativação de zimogênios. As enzimas digestivas ou da coagulação ativas são inativadas pela ligação irreversível a proteínas inibitórias específicas, que atuam como iscas irresistíveis para a sua presa molecular.

5. *Controle da quantidade de enzima presente.* A atividade enzimática também pode ser regulada pelo ajuste da quantidade de enzima presente. Essa forma importante de regulação ocorre

habitualmente ao nível da transcrição. O controle da transcrição gênica será considerado no Capítulo 31.

Para começar, analisaremos os princípios do alosterismo ao examinarmos a enzima aspartato transcarbamilase.

10.1 A aspartato transcarbamilase é inibida alostericamente pelo produto final da sua via

A aspartato transcarbamilase catalisa a primeira etapa da biossíntese das pirimidinas: a condensação do aspartato com carbamilfosfato para formar *N*-carbamilaspartato e ortofosfato (Figura 10.1). Essa reação é a etapa comprometida da via que, por fim, irá produzir nucleotídios pirimidínicos, como a citidina trifosfato (CTP). Como essa enzima é regulada para gerar precisamente a quantidade de CTP necessária para a célula?

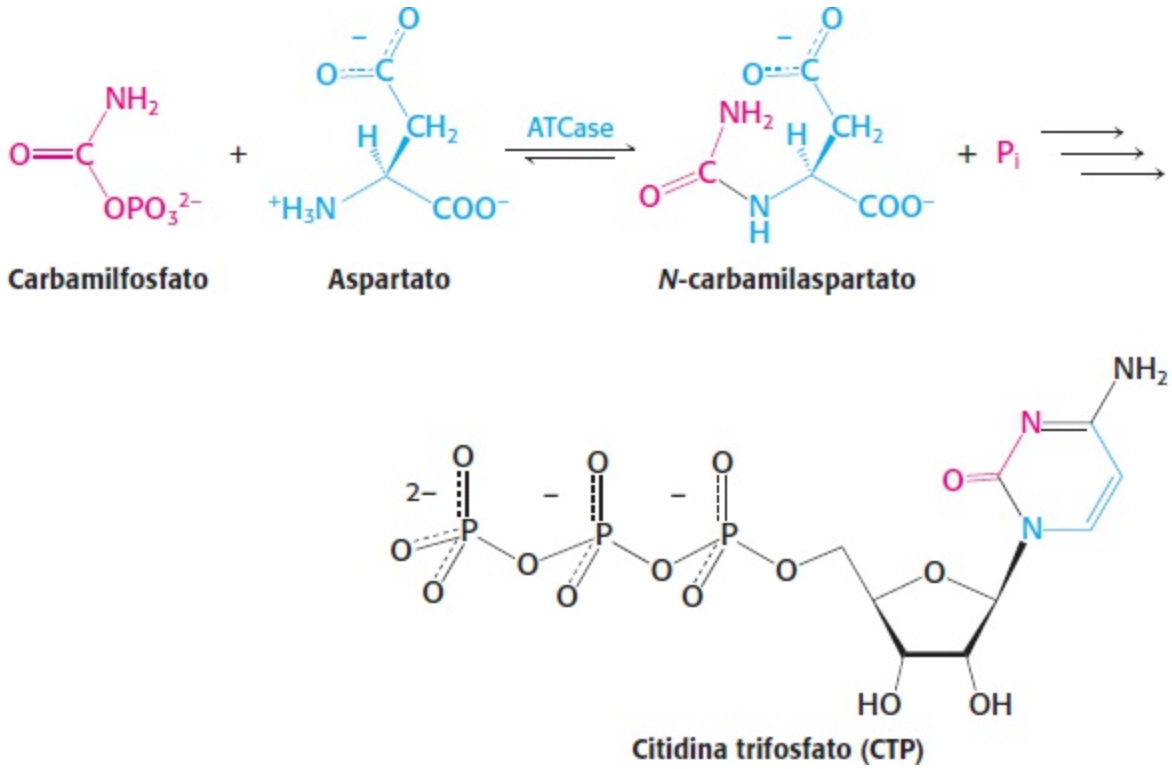


Figura 10.1 Reação da ATCase. A aspartato transcarbamilase catalisa a etapa comprometida, isto é, a condensação do aspartato com carbamilfosfato para formar *N*-carbamilaspartato na síntese de pirimidinas.

John Gerhart e Arthur Pardee constataram que a ATCase é inibida pela CTP, o produto final da via iniciada pela ATCase. A velocidade da reação catalisada pela ATCase.é rápida em baixas concentrações de CTP, porém diminui à medida que a concentração de CTP aumenta (Figura 10.2). Por conseguinte, a via continua produzindo novas moléculas de pirimidinas, até haver acúmulo de quantidades suficientes de CTP. A inibição da ATCase pela CTP fornece um exemplo de *inibição por retroalimentação, isto é*, a inibição de uma enzima pelo produto final da via. A inibição por retroalimentação pela CTP assegura que o *N*-carbamilaspartato e os intermediários subsequentes da via não sejam desnecessariamente formados quando as pirimidinas estão presentes em quantidades abundantes.

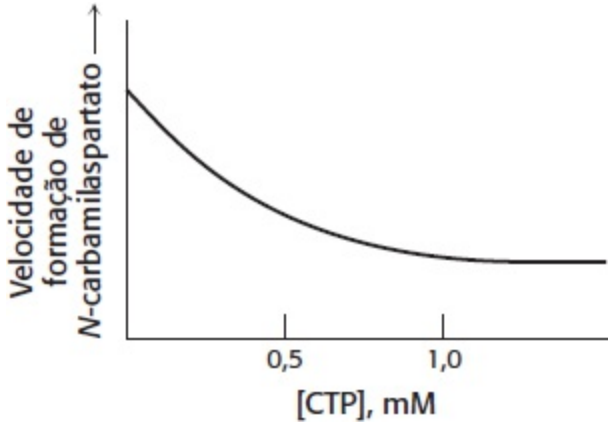


Figura 10.2 A CTP inibe a ATCase. A citidina trifosfato, um produto final da via de síntese das pirimidinas, inibe a aspartato transcarbamilase, embora tenha pouca semelhança estrutural com os reagentes ou produtos.

A capacidade de inibição da CTP é notável, visto que *a CTP é estruturalmente muito diferente dos substratos da reação* (ver Figura 10.1). Por conseguinte, a CTP precisa se ligar a um sítio distinto do sítio ativo ao qual se liga o substrato. Esses locais são denominados *sítios alostéricos* ou *regulatórios*. A CTP é um exemplo de *inibidor alostérico*. Na ATCase (mas não em todas as enzimas reguladas alostericamente), os sítios catalíticos e os regulatórios encontram-se em cadeias polipeptídicas separadas.

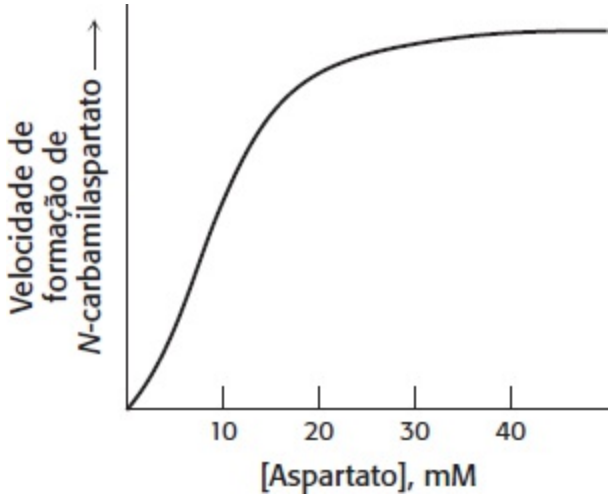


Figura 10.3 A ATCase exibe uma cinética sigmoide. O gráfico da formação do produto em função da concentração substrato produz uma curva sigmoide, visto que a ligação do substrato a um sítio ativo aumenta a atividade nos outros sítios ativos. Assim, a enzima exibe cooperatividade.

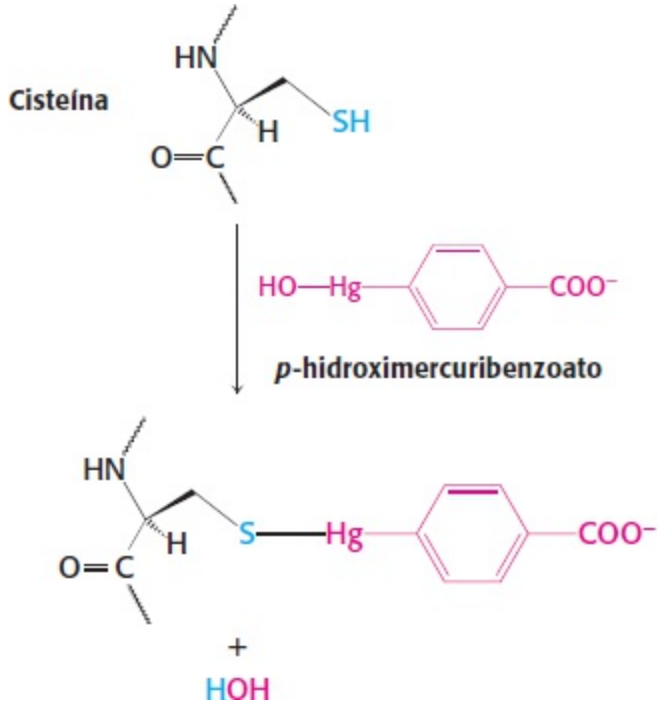


Figura 10.4 Modificação de resíduos de cisteína. O *p*-hidroximercuribenzoato reage com resíduos de cisteína cruciais na aspartato transcarbamilase.

Enzimas com regulação alostérica não obedecem à cinética de Michaelis-Menten

As enzimas alostéricas distinguem-se pela sua resposta a mudanças na concentração de substrato, além de sua suscetibilidade à regulação por outras moléculas. Examinemos a velocidade de formação do produto em função da concentração de substrato para a ATCase (Figura 10.3). A curva obtida difere daquela esperada para uma enzima que segue a cinética de Michaelis-Menten. A curva observada é designada como sigmoide, visto que ela se assemelha à letra "S". A grande maioria das enzimas alostéricas apresenta uma cinética sigmoide. Com base na discussão da hemoglobina, podemos lembrar que as curvas sigmoides resultam da cooperação entre subunidades: a ligação do substrato a um sítio ativo em uma molécula aumenta a probabilidade de esse substrato se ligar a outros sítios ativos. Para entender a base da cinética sigmoide das enzimas e da inibição pela CTP, precisamos examinar a estrutura da ATCase.

A ATCase é constituída de subunidades catalíticas e regulatórias separáveis

Qual é a evidência de que a ATCase apresenta sítios regulatórios e catalíticos distintos? A ATCase pode ser literalmente separada em subunidades regulatórias (r) e catalíticas (c) mediante tratamento com um composto de mercúrio, como o *p*-hidroximercuribenzoato, que reage com grupos sulfidrila (Figura 10.4). A ultracentrifugação após tratamento com mercuriais revelou que a ATCase é constituída de dois tipos de subunidades (Figura 10.5). As subunidades podem ser prontamente separadas por cromatografia de troca iônica, já que elas diferem acentuadamente na sua carga, ou por centrifugação em um gradiente de densidade de sacarose, visto que elas diferem quanto ao tamanho. Essas diferenças de tamanho manifestam-se nos coeficientes de sedimentação: o da enzima nativa é de 11,6S, enquanto os das subunidades dissociadas são de 2,8S e 5,8S. Os grupos *p*-mercuribenzoato ligados podem ser removidos das subunidades separadas pela adição de um excesso de mercaptoetanol, fornecendo as subunidades isoladas para estudo.

A subunidade maior é a *subunidade catalítica.* Essa subunidade exibe atividade catalítica, porém não responde à CTP e não exibe cinética sigmoide. A subunidade menor isolada pode ligar-se à CTP, porém carece de atividade catalítica. Por conseguinte, essa subunidade é denominada *subunidade regulatória.* A subunidade catalítica (c_3) consiste em três cadeias (cada uma de 34 kDa), enquanto a subunidade regulatória (r_2) é constituída de duas cadeias (cada uma de 17 kDa). As subunidades catalíticas e regulatórias combinam-se rapidamente quando são misturadas. O complexo resultante tem a mesma estrutura, c_6r_6 da enzima nativa: dois trímeros catalíticos e três dímeros regulatórios.

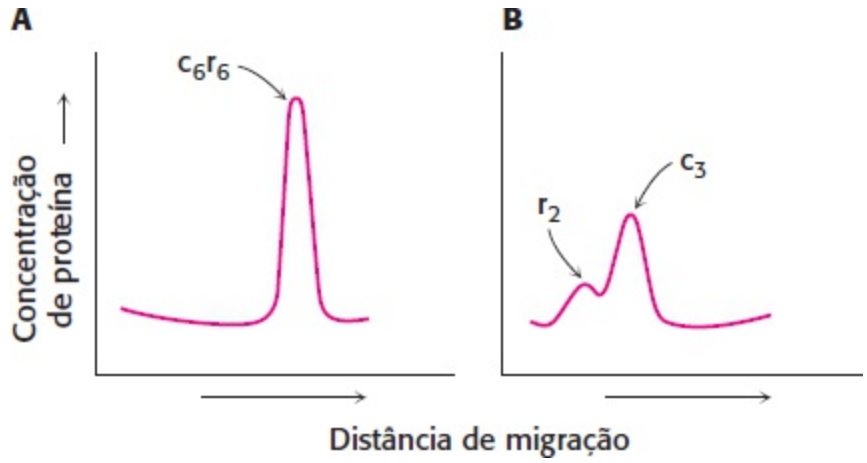


Figura 10.5 Estudos de ultracentrifugação da ATCase. Os padrões de velocidade de sedimentação da ATCase nativa (**A**) e da enzima (**B**) após tratamento com *p*-hidroximercuribenzoato mostram que a enzima pode ser dissociada em subunidades regulatória (r) e catalítica (c). [De J. C. Gerhart e H. K. Schachman. *Biochemistry* 4:1054-1062, 1965.]

$$2c_3 + 3\ r_2\ \→\ c_6r_6$$

De modo mais notável, a enzima reconstituída apresenta as mesmas propriedades alostéricas e cinéticas que as da enzima nativa. Assim, a ATCase é composta de subunidades catalíticas e regulatórias distintas, e *a interação das subunidades na enzima nativa produz as suas propriedades regulatórias e catalíticas.*

As interações alostéricas na ATCase são mediadas por grandes alterações na estrutura quaternária

Quais são as interações de subunidades que respondem pelas propriedades da ATCase? Pistas importantes foram obtidas com a estrutura tridimensional da ATCase em várias formas. Dois trímeros catalíticos estão empilhados um em cima do outro, ligados por três dímeros das cadeias regulatórias (Figura 10.6). Existem contatos significativos entre as subunidades catalíticas e regulatórias: cada cadeia r dentro de um dímero regulatório interage com uma cadeia c dentro de um trímero catalítico. A cadeia c estabelece contato com um domínio estrutural na cadeia r, que é estabilizado por um íon zinco ligado a quatro resíduos de cisteína. O composto mercurial *p*-hidroximercuribenzoato é capaz de dissociar as subunidades catalíticas e regulatórias, visto que o mercúrio se liga fortemente aos resíduos de cisteína, deslocando o zinco e desestabilizando esse domínio da subunidade r.

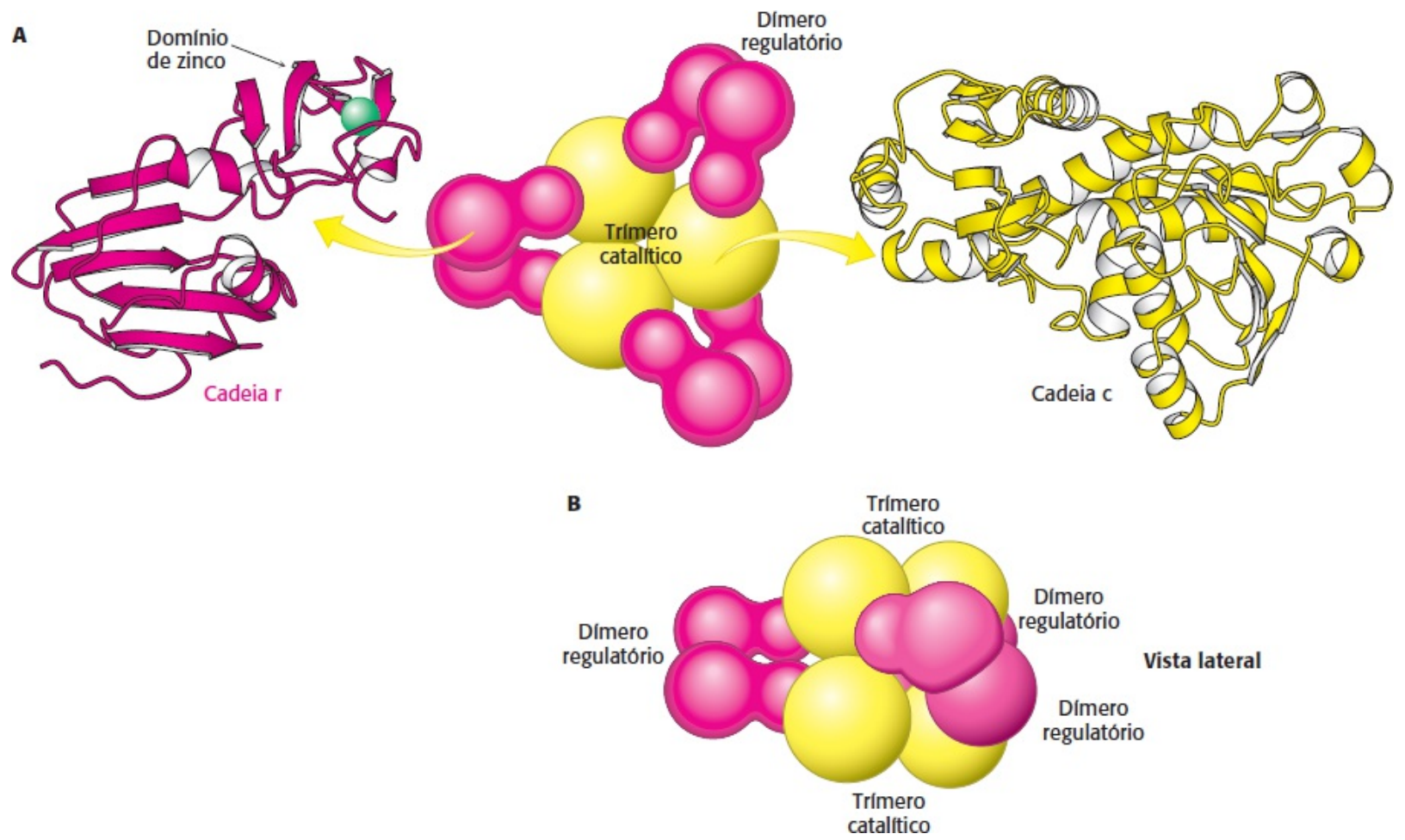


Figura 10.6 Estrutura da ATCase. **A.** A estrutura quaternária da aspartato transcarbamilase vista de cima. O esquema no centro é uma representação simplificada das relações entre as subunidades. Um único trímero catalítico [cadeias catalíticas (c), mostradas em amarelo] é visível; nessa vista, o segundo trímero está escondido abaixo do aparente. *Observe* que cada cadeia r interage com uma cadeia c através do domínio de zinco. **B.** Vista lateral do complexo. [Desenhada a partir de 1 RAI.pdb.]

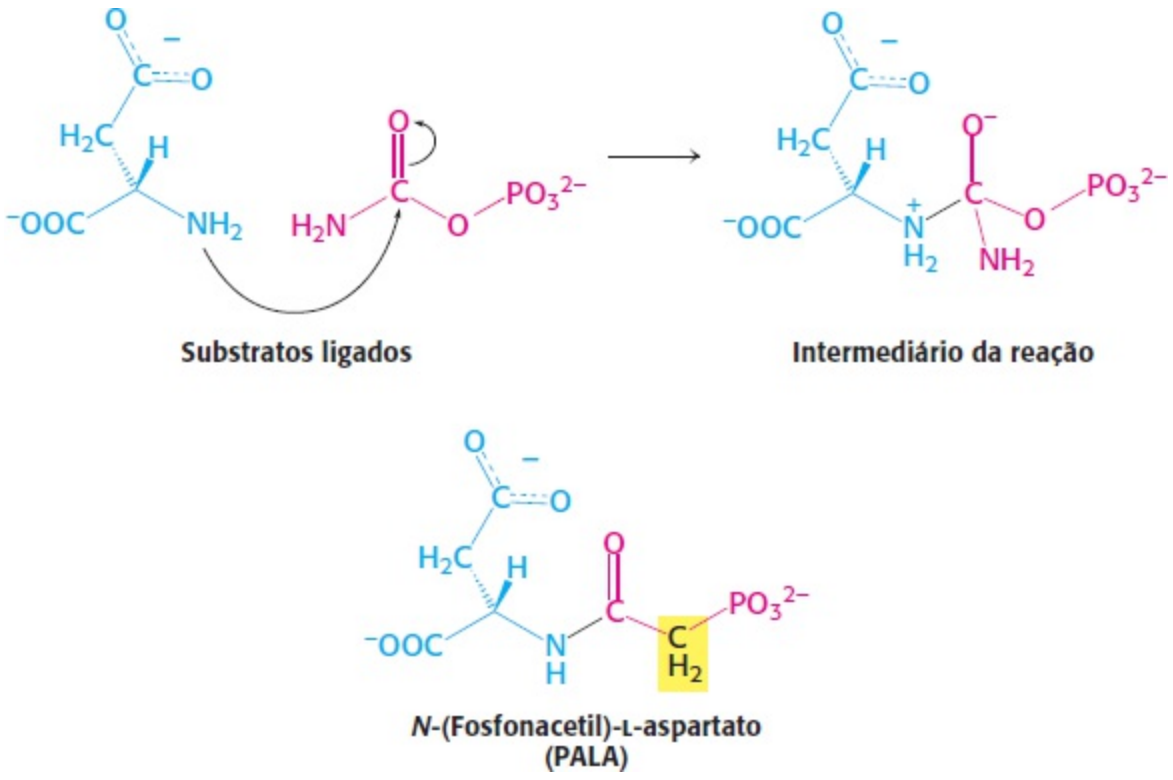


Figura 10.7 PALA, um análogo bissubstrato. (Acima). O ataque nucleofílico do grupo amino do aspartato no átomo de carbono carbonílico do carbamilfosfato produz um intermediário na via de formação do *N*-carbamilaspartato. (Embaixo) O

N-(fosfonacetil)-L-aspartato (PALA) é um análogo do intermediário da reação e um potente inibidor competitivo da aspartato transcarbamilase.

Para localizar os sítios ativos, a enzima foi cristalizada na presença de *N*-(fosfonacetil)-L-aspartato (PALA), um análogo bissubstrato (dos dois substratos), que se assemelha a um intermediário na via de catálise (Figura 10.7). O PALA é um potente inibidor competitivo da ATCase; liga-se aos sítios ativos e os bloqueia. A estrutura do complexo ATCase-PALA revela que o PALA liga-se a sítios localizados nos limites entre pares de cadeias c dentro de um trímero catalítico (Figura 10.8). Cada trímero catalítico contribui com três sítios ativos para a enzima completa. Um exame mais atento do complexo ATCase-PALA revela uma alteração notável da estrutura quaternária após a ligação do PALA. Os dois trímeros catalíticos movem-se se distanciando de 12 Å e sofrem uma rotação de aproximadamente 10° em torno de seu eixo de simetria triangular comum. Além disso, os dímeros regulatórios sofrem rotação de aproximadamente 15° para acomodar esse movimento (Figura 10.9). A enzima literalmente se expande com a ligação do PALA. Em essência, a ATCase apresenta duas formas quaternárias distintas: uma que predomina na ausência de substrato, ou de análogos do substrato, e outra que predomina quando substratos ou análogos estão ligados. Essas formas são designadas, respectivamente, como estado T (tenso) e estado R (relaxado), como fizemos para os dois estados quaternários da hemoglobina.

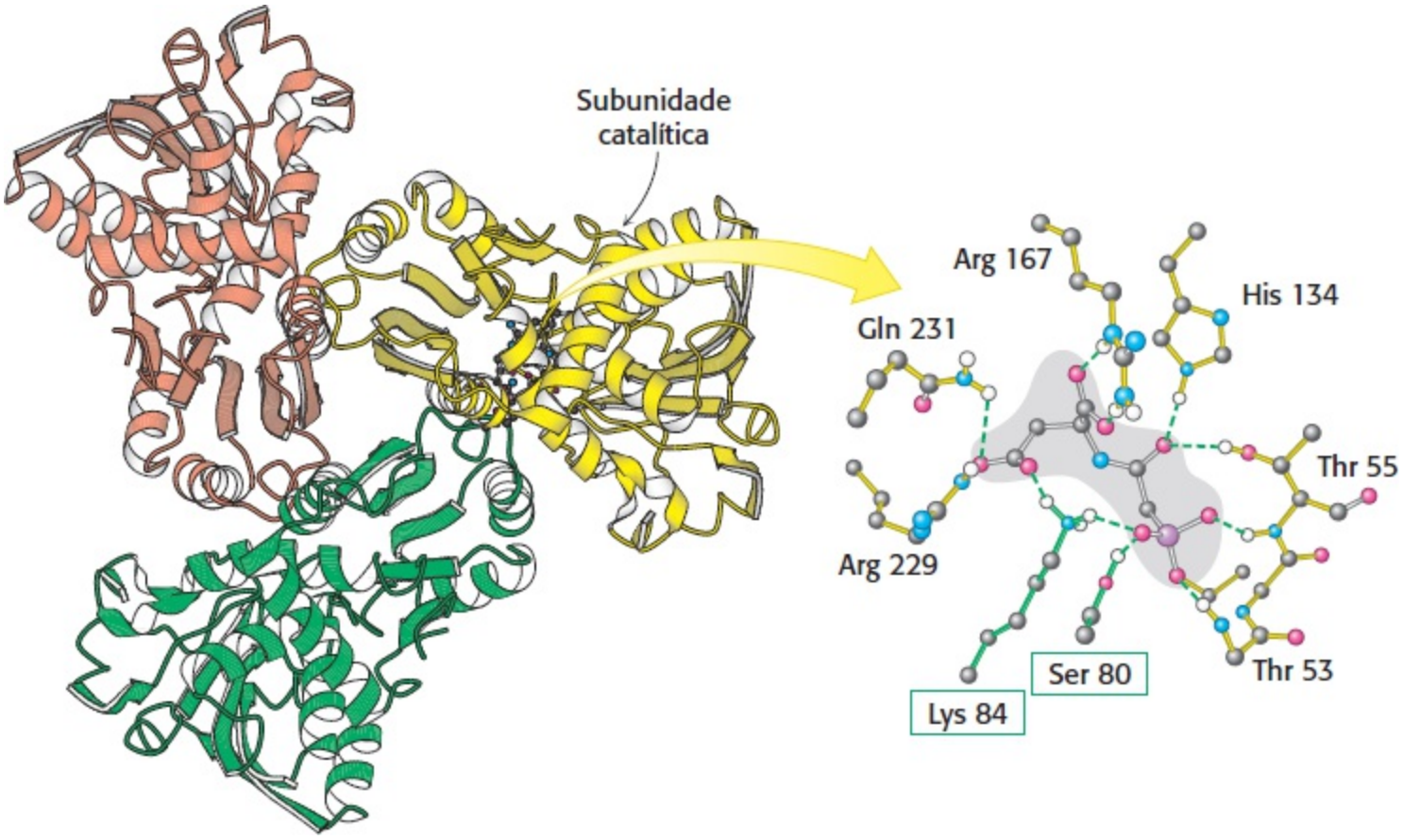


Figura 10.8 O sítio ativo da ATCase. Alguns dos resíduos cruciais do sítio ativo são mostrados ligados ao inibidor PALA (em cinza). *Observe* que o sítio ativo é composto principalmente de resíduos de uma cadeia c, porém uma cadeia c adjacente também contribui com resíduos importantes (destacados em verde). [Desenhada a partir de 8ATC.pdb.]

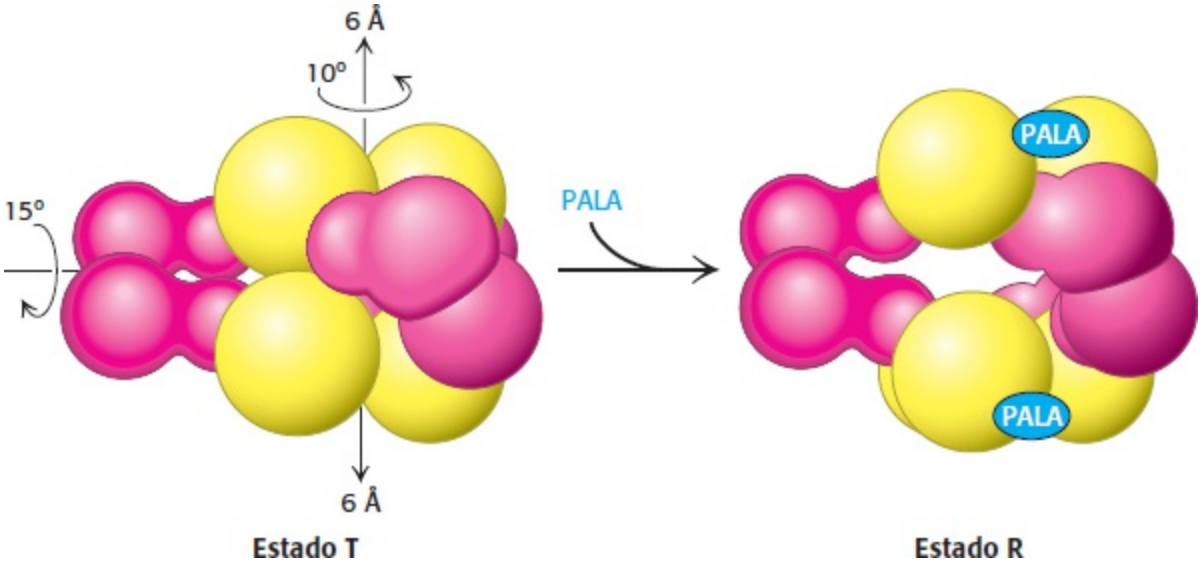


Figura 10.9 A transição do estado T para o estado R na ATCase. A aspartato transcarbamilase existe em duas conformações: uma forma compacta e relativamente inativa, denominada estado tenso (T), e uma forma expandida, denominada estado relaxado (R). *Observe* que a estrutura da ATCase modifica-se drasticamente na transição do estado T para o estado R. A ligação do PALA estabiliza o estado R.

Como podemos explicar a cinética sigmoide da enzima à luz das observações estruturais? À semelhança da hemoglobina, a enzima existe em um equilíbrio entre os estados T e R. Na ausência de substrato, quase todas as moléculas da enzima encontram-se no estado T. O estado T tem baixa afinidade pelo substrato e, portanto, exibe baixa atividade catalítica. A ligação ocasional de uma molécula de substrato a um sítio ativo da enzima aumenta a probabilidade de que toda a enzima passe para o estado R, com sua maior afinidade de ligação. A adição de mais substrato tem dois efeitos. Em primeiro lugar, aumenta a chance de cada molécula da enzima se ligar a pelo menos uma molécula de substrato. Em segundo lugar, aumenta o número médio de moléculas de substrato ligadas a cada enzima. A presença de uma quantidade adicional de substrato aumentará a fração de moléculas da enzima no estado R mais ativo, visto que *a posição do equilíbrio depende do número de sítios ativos que estejam ocupados pelo substrato.* Já consideramos essa propriedade, a *cooperatividade,* quando discutimos a curva sigmoide de ligação da hemoglobina ao oxigênio; ela é assim denominada pois as subunidades cooperam umas com as outras. Os efeitos dos substratos sobre as enzimas alostéricas são designados *como efeitos homotrópicos* (do grego *homós,* "mesmo").

Esse mecanismo de regulação alostérica é chamado de *mecanismo concertado (ou coordenado),* visto que a alteração na enzima é "tudo ou nada"; toda a enzima é convertida de seu estado T em estado R, afetando igualmente todos os sítios catalíticos. Por outro lado, o *modelo sequencial* supõe que a ligação do ligante a um sítio no complexo pode afetar os sítios adjacentes, sem que todas as subunidades sofram a transição do estado T para R. Embora o mecanismo concertado (coordenado) possa explicar de modo satisfatório o comportamento da ATCase, a maioria das outras enzimas alostéricas exibe características de ambos os modelos.

A curva sigmoide da ATCase pode ser representada como um complexo de duas curvas de Michaelis-Menten, uma correspondendo ao estado T, e a outra, ao estado R. Um aumento na concentração de substrato favorece a transição da curva do estado T para a curva do estado R (Figura 10.10). Observe que esse comportamento sigmoide tem uma consequência adicional: na faixa de concentração em que ocorre a transição de T para R, a curva depende acentuadamente da concentração de substrato. A enzima é deslocada de um estado menos ativo para um mais ativo

dentro de uma estreita faixa de concentração de substrato. Esse comportamento é benéfico quando uma resposta a pequenas mudanças na concentração de substrato é fisiologicamente importante.

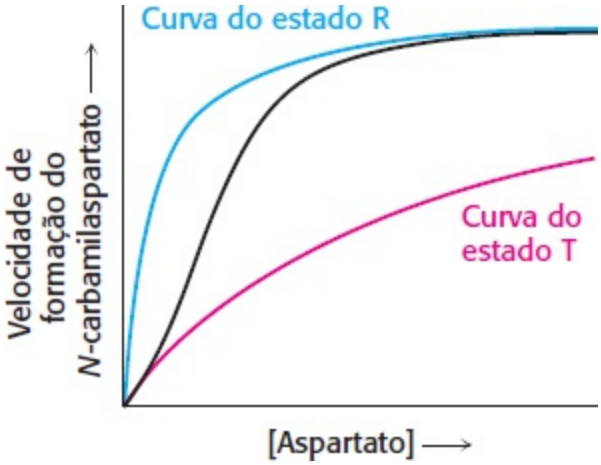


Figura 10.10 Base para a curva sigmoide. Pode-se entender melhor a geração da curva sigmoide pela propriedade da cooperatividade imaginando uma enzima alostérica como uma mistura de duas enzimas de Michaelis-Menten, uma com alto valor de K_M, que corresponde ao estado T, e outra com baixo valor de K_M, que corresponde ao estado R. À medida que aumenta a concentração de substrato, o equilíbrio desloca-se do estado T para o estado R, resultando em uma acentuada elevação da atividade em relação à concentração de substrato.

Em estudos do trímero catalítico isolado, a subunidade catalítica exibe a curva hiperbólica característica da cinética de Michaelis-Menten, que é indistinguível da curva deduzida para o estado R (Figura 10.10). Por conseguinte, o termo *tenso* é apropriado: no estado T, os dímeros regulatórios mantêm os dois trímeros catalíticos próximos uns dos outros o suficiente para que alças-chave em sua superfície colidam e interfiram nos ajustes de conformação necessários para a alta afinidade de ligação ao substrato e a catálise.

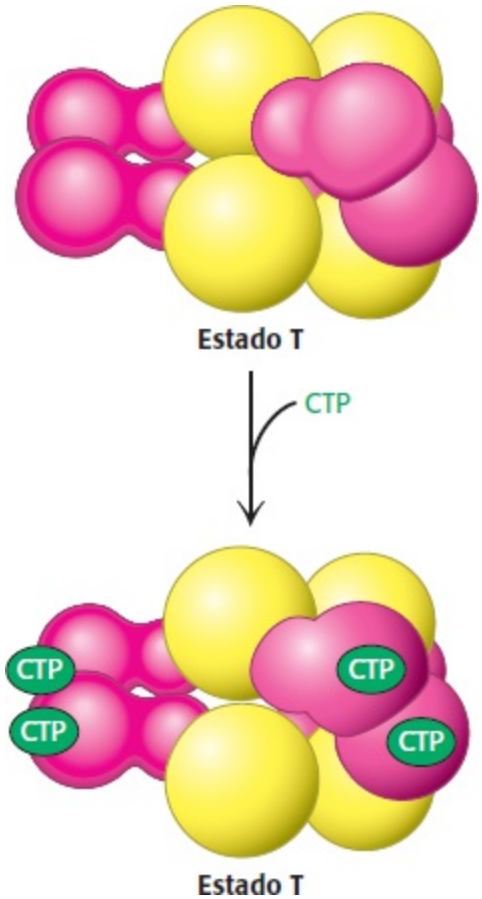


Figura 10.11 A CTP estabiliza o estado T. A ligação de CTP à subunidade regulatória da aspartato transcarbamilase estabiliza o estado T.

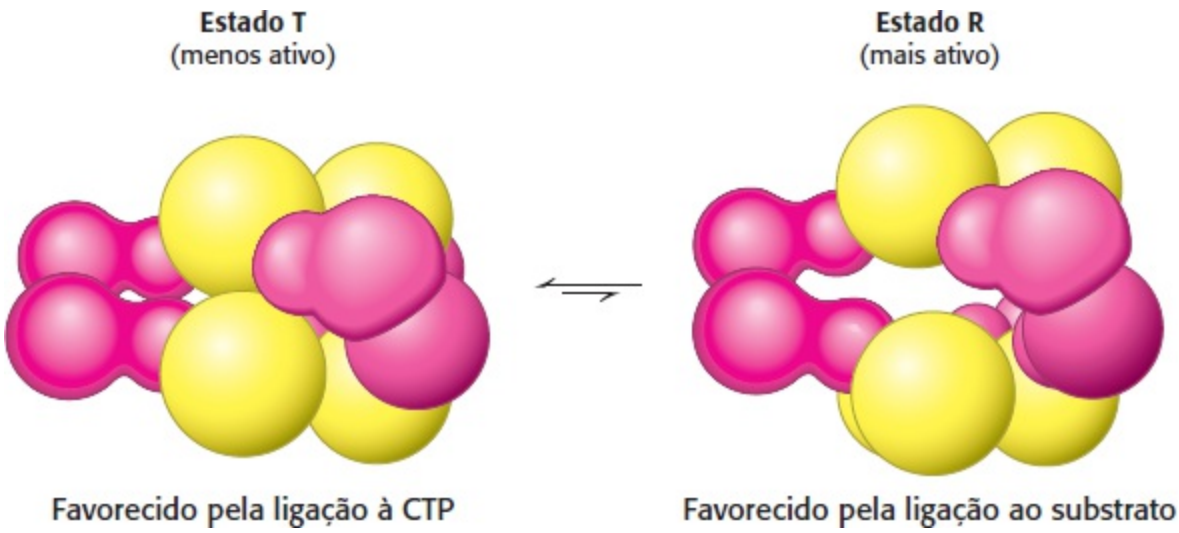


Figura 10.12 Os estados R e T estão em equilíbrio. Mesmo na ausência de qualquer substrato ou reguladores, a aspartato transcarbamilase existe, em equilíbrio entre os estados R e T. Nessas condições, o estado T é favorecido por um fator de aproximadamente 200.

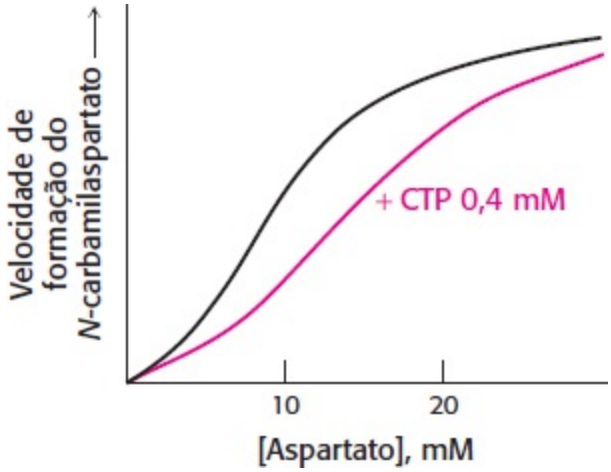


Figura 10.13 Efeito da CTP sobre a cinética da ATCase. A citidina trifosfato (CTP) estabiliza o estado T da aspartato transcarbamilase, tornando mais difícil a conversão da enzima no estado R pela ligação do substrato. Em consequência, a curva é deslocada para a direita, como mostrado em vermelho.

Os reguladores alostéricos modulam o equilíbrio entre T e R

Analisemos agora os efeitos da CTP. Conforme assinalamos anteriormente, a CTP inibe a ação da ATCase. Estudos da ATCase com raios X na presença de CTP revelaram (1) que a enzima encontra-se no estado T quando ligada à CTP e (2) que existe um sítio de ligação para esse nucleotídio em cada cadeia regulatória, em um domínio que não interage com a subunidade catalítica (Figura 10.11). Cada sítio ativo está a uma distância de mais de 50 Å do sítio de ligação de CTP mais próximo. Surge naturalmente a seguinte questão: como a CTP pode inibir a atividade catalítica da enzima quando ela não interage com a cadeia catalítica?

As alterações da estrutura quaternária observadas com a ligação do análogo de substratos sugerem um mecanismo para a inibição pela CTP (Figura 10.12). *A ligação do inibidor CTP desvia o equilíbrio para o estado T, diminuindo a atividade efetiva da enzima.* A ligação da CTP torna mais difícil a conversão da enzima no estado R pela ligação do substrato. Em consequência, a CTP

aumenta a fase inicial da curva sigmoide (Figura 10.13). É necessária maior quantidade de substrato para alcançar uma determinada velocidade de reação.

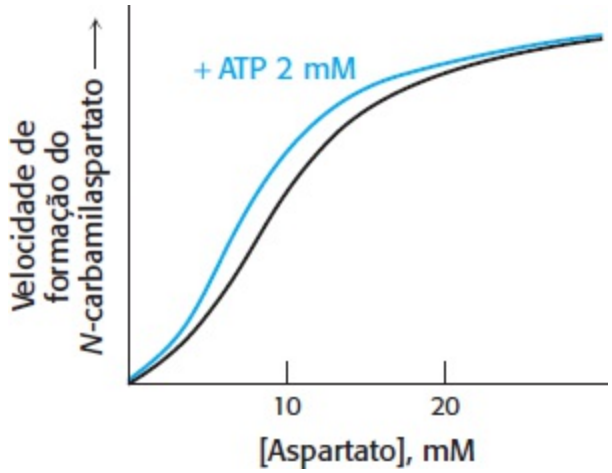


Figura 10.14 Efeito do ATP sobre a cinética da ATCase. O ATP é um ativador alostérico da aspartato transcarbamilase, uma vez que ele estabiliza o estado R, facilitando a ligação ao substrato. Em consequência, a curva é deslocada para a esquerda, como mostrado em azul.

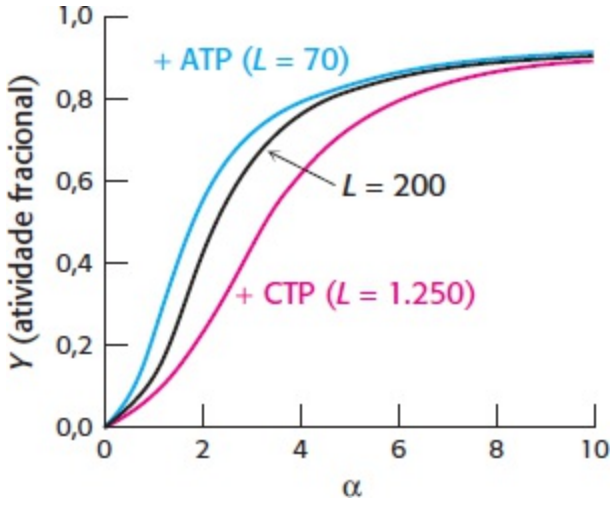


Figura 10.15 Descrição quantitativa do modelo concertado. Nessa descrição do modelo ajustado, a atividade fracional, *Y*, é a fração dos sítios ativos ligados ao substrato e é diretamente proporcional à velocidade da reação; α é a razão entre [S] e a constante de dissociação de S com a enzima no estado R; e *L* é a razão entre a concentração da enzima no estado T e a concentração no estado R. A ligação dos reguladores ATP e CTP à ATCase altera o valor de *L* e, portanto, a resposta à concentração do substrato. Para a construção dessas curvas, foi usada a fórmula que descreve o modelo concertado no apêndice do Capítulo 7, com $c = 0{,}1$ e $n = 6$.

É interessante assinalar que o ATP também é um efetor alostérico da ATCase. Entretanto, o efeito do ATP consiste em *aumentar* a velocidade da reação em determinada concentração de aspartato (Figura 10.14). Na presença de altas concentrações de ATP, o perfil cinético exibe um comportamento sigmoide menos pronunciado. O ATP compete com a CTP pela sua ligação aos sítios regulatórios. Em consequência, altos níveis de ATP impedem a inibição da enzima pela CTP. Os efeitos de moléculas que não são substratos sobre as enzimas alostéricas (como os da CTP e do ATP sobre a ATCase) são designados como *efeitos heterotrópicos* (do grego *héteros,* "diferente"). Os substratos geram a curva sigmoide (efeitos homotrópicos), enquanto os reguladores deslocam o K_M (efeitos heterotrópicos). Todavia, convém observar que ambos os tipos de efeito são gerados pela alteração da razão T/R.

O aumento da atividade da ATCase em resposta a uma concentração aumentada de ATP tem duas explicações fisiológicas possíveis. Em primeiro lugar, o ATP em altas concentrações sinaliza alta concentração de nucleotídios purínicos na célula; o aumento da atividade da ATCase tende a equilibrar os reservatórios de purinas e de pirimidinas. Em segundo lugar, o ATP em alta concentração indica que existe energia disponível para a síntese de mRNA e a replicação do DNA, levando à síntese das pirimidinas necessárias para esses processos.

O Apêndice do Capítulo 7 inclui uma descrição quantitativa do modelo concertado. Embora desenvolvido para descrever um processo de ligação, esse modelo também se aplica à atividade enzimática, visto que a fração dos sítios ativos da enzima com o substrato ligado é proporcional à atividade enzimática. Um aspecto essencial desse modelo é o equilíbrio entre os estados T e R. Definimos L como a constante de equilíbrio entre as formas R e T.

$$\mathrm{R} \rightleftharpoons \mathrm{T} \qquad L = \frac{\mathrm{T}}{\mathrm{R}}$$

Os efeitos da CTP e do ATP podem ser modelados simplesmente ao modificar o valor de L. Para a forma saturada com CTP, o valor de L aumenta de 200 para 1.250. Por conseguinte, é necessária uma maior quantidade de substrato para desviar apreciavelmente o equilíbrio para a forma R. Para a forma saturada com ATP, o valor de L diminui para 70 (Figura 10.15).

Por conseguinte, o modelo concertado nos fornece uma boa descrição do comportamento cinético da ATCase na presença de seus principais reguladores.

10.2 As isozimas fornecem um meio de regulação específica para diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento

As *isozimas,* ou *isoenzimas,* são enzimas que diferem na sua sequência de aminoácidos, mas que catalisam a mesma reação. Em geral, essas enzimas exibem diferentes parâmetros cinéticos, como K_M, ou respondem a diferentes moléculas reguladoras. São codificadas por genes diferentes, que habitualmente surgem por duplicação e divergência de genes. As isoenzimas frequentemente podem ser distinguidas umas das outras pelas suas propriedades bioquímicas, como a mobilidade eletroforética.

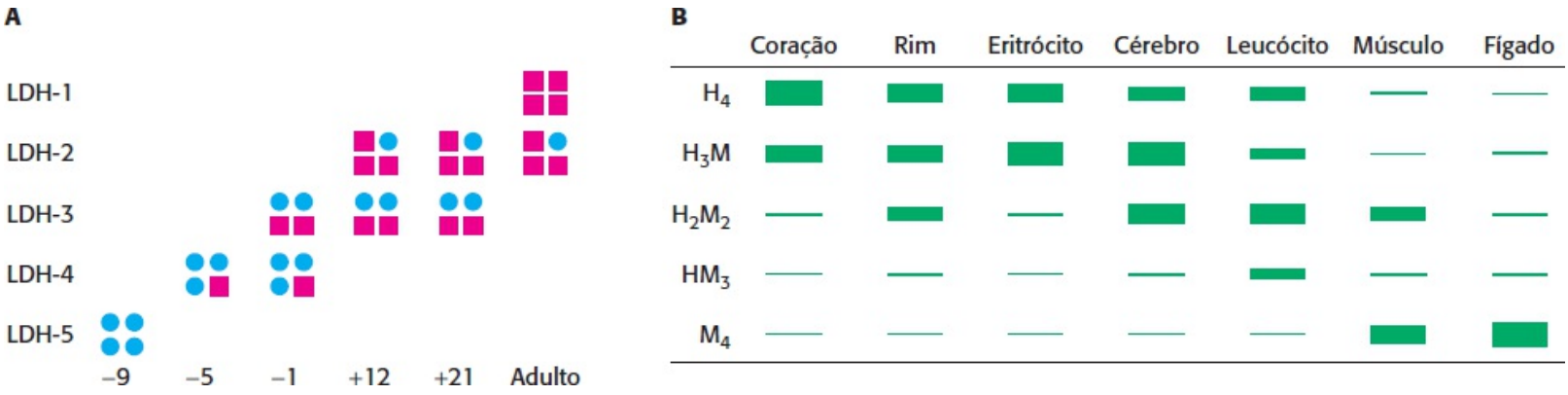


Figura 10.16 Isoenzimas da lactato desidrogenase. **A.** O perfil das isoenzimas da lactato desidrogenase (LDH) do coração de rato modifica-se durante o desenvolvimento. A isoenzima H é representada por quadrados, e a isoenzima M, por círculos. Os números positivos e negativos denotam, respectivamente, os dias antes e depois do nascimento. **B.** O

conteúdo das isoenzimas da LDH varia de acordo com o tecido. [A, De W.-H. Li, *Molecular Evolution* (Sinauer, 1997), p. 283; B, de K. Urich, *Comparative Animal Biochemistry* (Springer Verlag, 1990), p. 542.]

A existência de isozimas possibilita o controle fino do metabolismo para suprir as necessidades de determinado tecido ou estágio de desenvolvimento. Considere o exemplo da lactato desidrogenase (LDH), uma enzima que catalisa uma etapa no metabolismo anaeróbico da glicose e na síntese de glicose. Os seres humanos têm duas cadeias polipeptídicas isozímicas para essa enzima: a isozima H é altamente expressa no músculo cardíaco, e a isozima M é expressa no músculo esquelético. As sequências de aminoácidos são 75% idênticas. Cada enzima funcional é um tetrâmero, e são possíveis muitas combinações diferentes das duas cadeias polipeptídicas isozímicas. A isoenzima H_4, que é encontrada no coração, exibe maior afinidade pelos substratos do que a isoenzima M_4. As duas isoenzimas também diferem pelo fato de que o piruvato em altos níveis inibe alostericamente a isoenzima H_4, mas não a M_4. As outras combinações, como H_3M, exibem propriedades intermediárias. Discutiremos essas isoenzimas em seu contexto biológico no Capítulo 16.

A isoenzima M_4 apresenta uma função ótima no ambiente anaeróbico do músculo esquelético em intensa atividade, enquanto a isoenzima H_4 o faz no ambiente aeróbico do músculo cardíaco. Com efeito, as proporções dessas isoenzimas modificam-se durante o desenvolvimento do coração de rato, à medida que o tecido passa de um ambiente anaeróbico para um aeróbico (Figura 10.16A). A Figura 10.16B mostra as formas teciduais específicas da lactato desidrogenase nos tecidos adultos de rato.

O aparecimento de algumas isoenzimas no sangue constitui um sinal de lesão tecidual, útil para o diagnóstico clínico. Por exemplo, um aumento dos níveis séricos de H_4 em relação a H_3M fornece uma indicação de que um infarto do miocárdio ou ataque cardíaco provocou lesão das células cardíacas, resultando em liberação de material celular.

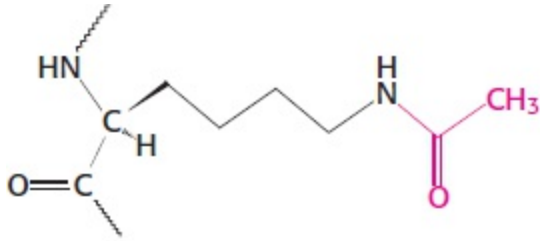
10.3 A modificação covalente constitui um meio de regular a atividade enzimática

A ligação covalente de uma molécula a uma enzima ou proteína pode modificar a sua atividade. Nesses casos, uma molécula doadora fornece a fração funcional a ser ligada. A maioria das modificações são reversíveis. A fosforilação e a desfosforilação constituem os meios mais comuns de modificação covalente. A ligação de grupos acetila e a sua remoção constituem outros meios comuns. As histonas – proteínas que estão acondicionadas com DNA nos cromossomos – são extensivamente acetiladas e desacetiladas *in vivo* nos resíduos de lisina (Seção 31.3). As histonas mais intensamente acetiladas estão associadas a genes que estão sendo ativamente transcritos. As enzimas acetiltransferase e desacetilase são elas próprias reguladas por fosforilação, mostrando que a modificação covalente de uma proteína pode ser controlada pela modificação covalente das enzimas modificadoras.

A modificação não é prontamente reversível em alguns casos. A ligação irreversível de um grupo lipídico faz com que algumas proteínas em vias de transdução de sinais, como a Ras (uma GTPase) e a Src (uma proteína tirosina quinase), fiquem afixadas à face citoplasmática da membrana celular.

Quando fixadas neste local, as proteínas têm mais capacidade de receber e transmitir as informações que estão sendo passadas pelas suas vias de sinalização (Capítulo 14). São observadas mutações tanto da Ras quanto da Src em uma ampla variedade de cânceres. A fixação da ubiquitina, uma proteína pequena, pode sinalizar que uma proteína será destruída, constituindo o mecanismo final de regulação (Capítulo 23). A proteína ciclina precisa ser ubiquitinada e destruída antes que uma célula possa entrar em anáfase e prossiga pelo ciclo celular.

Praticamente todos os processos metabólicos que iremos examinar são regulados, em parte, por modificação covalente. Com efeito, as propriedades alostéricas de muitas enzimas são alteradas por modificação covalente. A Tabela 10.1 fornece uma lista de algumas das modificações covalentes comuns.



Lisina acetilada

Tabela 10.1 Modificações covalentes comuns da atividade proteica.

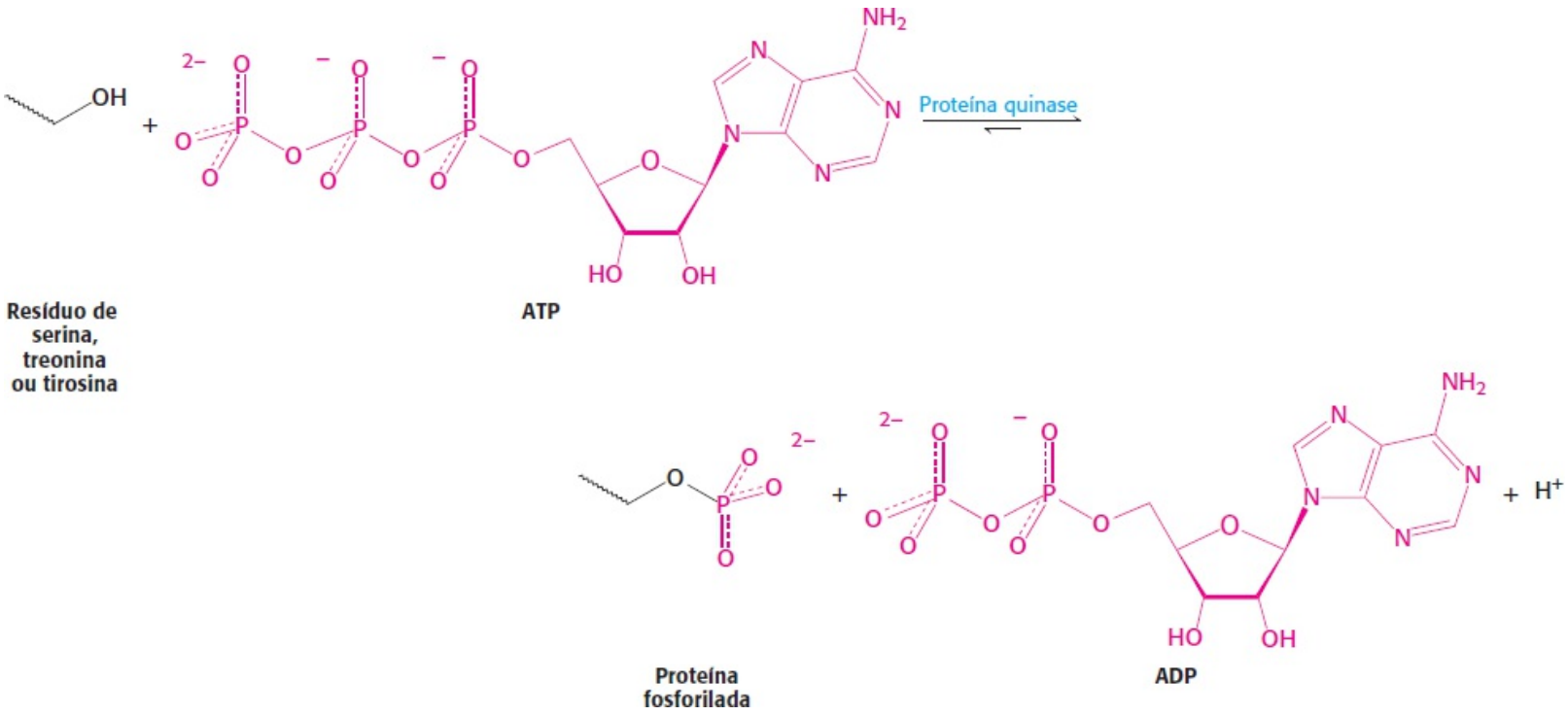
Modificação	Molécula doadora	Exemplo de proteína modificada	Função da proteína
Fosforilação	ATP	Glicogênio fosforilase	Homeostasia da glicose; transdução de energia
Acetilação	Acetil-CoA	Histonas	Acondicionamento do DNA; transcrição
Miristilação	Miristil CoA	Src	Transdução de sinais
Ribosilação do ADP	NAD+	RNA polimerase	Transcrição
Farnesilação	Farnesil pirofosfato	Ras	Transdução de sinais
γ-carboxilação	HCO_3^-	Trombina	Coagulação do sangue
Sulfatação	3′-fosfoadenosina-5′-fosfossulfato	Fibrinogênio	Formação do coágulo sanguíneo
Ubiquitinação	Ubiquitina	Ciclina	Controle do ciclo celular

As quinases e as fosfatases controlam o grau de fosforilação das proteínas

Veremos que a fosforilação é utilizada como mecanismo regulador em praticamente todos os processos metabólicos das células eucarióticas. De fato, até 30% das proteínas eucarióticas são fosforiladas. As enzimas que catalisam as reações de fosforilação são denominadas *proteína quinases*. Essas enzimas constituem uma das maiores famílias de proteínas conhecidas: existem mais

de 100 proteína quinases homólogas nas leveduras e mais de 500 nos seres humanos. Essa multiplicidade de enzimas possibilita o controle fino da regulação, de acordo com um tecido, momento ou substrato específico.

O ATP é o doador mais comum de grupos fosforila. O grupo fosforila terminal (γ) do ATP é transferido para um aminoácido específico da proteína ou enzima aceptora. Nos eucariotos, o resíduo aceptor é comumente um dos três que contêm um grupo hidroxila em sua cadeia lateral. As transferências para os resíduos de *serina* e *treonina* são efetuadas por uma classe de proteínas quinases, enquanto a transferência para resíduos de *tirosina* é feita por outra classe. As tirosinas quinases, que são exclusivas dos organismos multicelulares, desempenham um papel central na regulação do crescimento, e observa-se comumente a ocorrência de mutações dessas enzimas em células cancerosas.



A Tabela 10.2 fornece uma lista de algumas proteína quinases de resíduos de serina e treonina conhecidas. Os aceptores nas reações de fosforilação de proteínas estão localizados dentro das células, onde o doador de grupo fosforila, o ATP, é encontrado em quantidades abundantes. As proteínas totalmente extracelulares não são reguladas por fosforilação reversível.

As proteína quinases variam quanto a seu grau de especificidade: as *proteínas quinases dedicadas* fosforilam uma única proteína ou várias proteínas estreitamente relacionadas, enquanto as *proteína quinases multifuncionais* modificam muitos alvos diferentes; elas têm grande alcance e podem coordenar diversos processos. As comparações das sequências e aminoácidos de muitos sítios de fosforilação mostram que uma quinase multifuncional reconhece sequências relacionadas. Por exemplo, a *sequência de consenso* reconhecida pela proteína quinase A é Arg-Arg-X-*Ser*-Z ou Arg-Arg-X-*Tre*-Z, em que X é um resíduo pequeno, Z é um resíduo grande hidrofóbico e *Ser* ou *Thr* é o local de fosforilação. Entretanto, essa sequência não é absolutamente necessária. Por exemplo, a lisina pode substituir um dos resíduos de arginina, porém com alguma perda de afinidade. Pequenos peptídios sintéticos contendo um motivo de consenso são quase sempre fosforilados por quinases serina/treonina. Por conseguinte, *o principal determinante da especificidade é a sequência de*

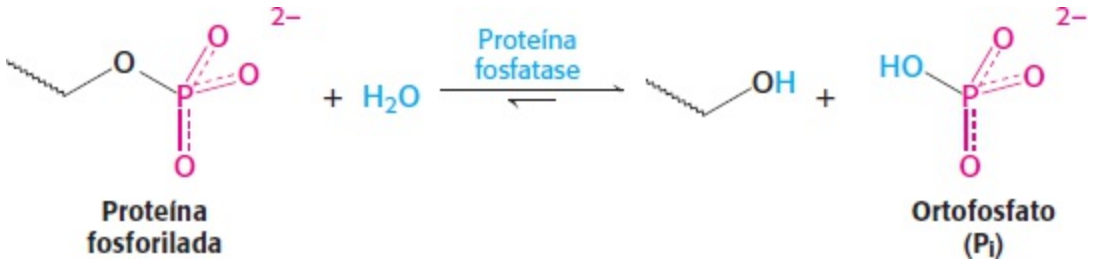
aminoácidos em torno do sítio de fosforilação de serina ou treonina. Todavia, resíduos distantes podem contribuir para a especificidade. Por exemplo, uma modificação na conformação da proteína pode abrir ou fechar o acesso a um possível sítio de fosforilação.

Tabela 10.2 Exemplos de serina e treonina quinases e seus sinais de ativação.

Sinal	Enzima
Nucleotídios cíclicos	Proteína quinase dependente de AMP cíclico Proteína quinase dependente de GMP cíclico
Ca^{2+} e calmodulina	Proteína quinase dependente de Ca^{2+} calmodulina Fosforilase quinase ou glicogênio sintase quinase 2
AMP	Quinase ativada por AMP
Diacilglicerol	Proteína quinase C
Intermediários metabólicos e outros efetores "locais"	Muitas enzimas com alvos específicos, como a piruvato desidrogenase quinase e a desidrogenase quinase de cetoácidos de cadeia ramificada

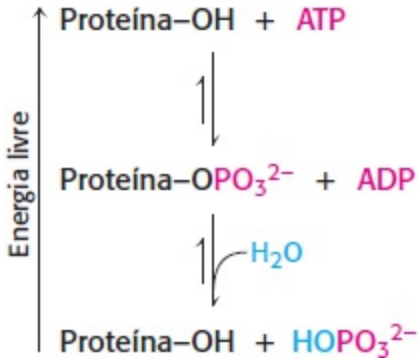
Fonte: De D. Fell, *Understanding the Control of Metabolism* (Portland Press, 1997), Tabela 7.2.

As *proteína fosfatases* revertem os efeitos das quinases ao catalisarem a remoção de grupos fosforila ligados às proteínas. A enzima hidrolisa a ligação que fixa o grupo fosforila.



A cadeia lateral contendo hidroxila não modificada é regenerada, e ocorre produção de ortofosfato (P_i). Essas enzimas desempenham um papel vital nas células, visto que interrompem as vias de sinalização que são ativadas por quinases. Uma classe de fosfatase altamente conservada, denominada PP2A, suprime a atividade promotora de câncer de certas quinases.

É importante ressaltar que as reações de fosforilação e desfosforilação não são o inverso uma da outra; cada uma é essencialmente irreversível em condições fisiológicas. Além disso, ambas as reações ocorrem em velocidades insignificantes na ausência de enzimas. Por conseguinte, a fosforilação de um substrato proteico só irá ocorrer pela ação de uma proteína quinase específica e à custa da clivagem de ATP, enquanto a desfosforilação só irá ocorrer pela ação de uma fosfatase. O resultado é que as proteínas-alvo se alternam unidirecionalmente entre as formas não fosforilada e fosforilada. A velocidade de reciclagem entre os estados fosforilado e desfosforilado depende das atividades relativas das quinases e das fosfatases.



A fosforilação é um meio altamente efetivo de regular as atividades das proteínas-alvo

A fosforilação é uma modificação covalente comum das proteínas em todas as formas de vida, o que leva à seguinte questão: o que faz a fosforilação das proteínas ser tão valiosa na regulação da função proteica a ponto de o seu uso ser ubíquo? A fosforilação é um meio altamente efetivo de controlar a atividade das proteínas por várias razões:

1. *A energia livre da fosforilação é grande.* Dos –50 kJ mol^{-1} (–12 kcal mol^{-1}) fornecidos pelo ATP, cerca da metade é consumida para tornar a fosforilação irreversível; a outra metade é conservada na proteína fosforilada. Uma mudança de energia livre de 5,69 kJ mol^{-1} (1,36 kcal mol^{-1}) corresponde a um fator de 10 em uma constante de equilíbrio. Por conseguinte, a fosforilação pode modificar o equilíbrio de conformação entre diferentes estados funcionais por um grande fator, da ordem de 10^4. Em essência, o gasto de energia possibilita um forte deslocamento de um estado para outro.

2. *Um grupo fosforila acrescenta duas cargas negativas a uma proteína modificada.* Essas novas cargas podem interromper interações eletrostáticas na proteína não modificada e possibilitar a formação de novas interações eletrostáticas. Essas mudanças estruturais podem alterar acentuadamente a ligação ao substrato e a atividade catalítica.

3. *Um grupo fosforila pode formar três ou mais pontes de hidrogênio.* A geometria tetraédrica de um grupo fosforila torna essas ligações altamente direcionais, possibilitando interações específicas com doadores de pontes de hidrogênio.

4. *A fosforilação e a desfosforilação podem ocorrer em menos de um segundo ou ao longo de horas.* A cinética pode ser ajustada para atender às necessidades de tempo de um processo fisiológico.

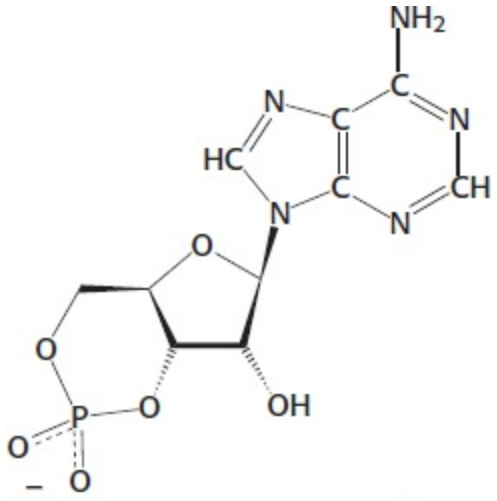
5. *A fosforilação frequentemente produz efeitos altamente amplificados.* Uma única molécula de quinase ativada pode fosforilar centenas de proteínas-alvo em um curto intervalo de tempo. Se a proteína-alvo for uma enzima, ela pode, por sua vez, transformar um grande número de moléculas de substrato.

6. *O ATP é a forma universal de energia celular* (Capítulo 15). O uso desse composto como doador de grupo fosforila liga o estado energético da célula à regulação do metabolismo.

O AMP cíclico ativa a proteína quinase A ao alterar a estrutura quaternária

Examinemos uma proteína quinase específica que ajuda os animais a enfrentarem situações estressantes. A resposta de "luta ou fuga" é comum a muitos animais quando se defrontam com uma situação perigosa ou excitante. O músculo prepara-se para a ação. Esse preparo resulta da atividade de uma determinada proteína quinase. Neste caso, o hormônio epinefrina (adrenalina) deflagra a formação do AMP cíclico (cAMP), um mensageiro intracelular formado pela ciclização do ATP. Subsequentemente, o AMP cíclico ativa uma enzima-chave: a *proteína quinase A* (PKA). A quinase altera a atividade das proteínas-alvo ao fosforilar resíduos específicos de serina ou treonina. O achado notável é que a *maioria dos efeitos do cAMP nas células eucarióticas é produzida por meio da ativação da PKA pelo cAMP.*

A PKA fornece um exemplo claro da integração entre a regulação alostérica e a fosforilação. A PKA é ativada por concentrações de cAMP próximas a 10 nM. O mecanismo de ativação lembra o da aspartato transcarbamilase. À exemplo dessa enzima, a PKA no músculo é constituída de dois tipos de subunidades: uma subunidade regulatória (R) de 49 kDa e uma subunidade catalítica (C) de 38 kDa. Na ausência de cAMP, as subunidades regulatórias e catalíticas formam um complexo R_2C_2, que é enzimaticamente inativo (Figura 10.17). A ligação de duas moléculas de cAMP a cada uma das subunidades regulatórias leva à dissociação do complexo R_2C_2 em uma subunidade R_2 e duas subunidades C. Essas subunidades catalíticas livres são então enzimaticamente ativas. Por conseguinte, *a ligação do cAMP à subunidade regulatória alivia a sua inibição da subunidade catalítica.* A PKA e a maioria das outras quinases existem em formas isozímicas para a regulação de controle fino, a fim de suprir as necessidades de uma célula específica ou de determinado estágio do desenvolvimento.



Adenosina monofosfato cíclico (cAMP)

Como a ligação do cAMP ativa a quinase? Cada cadeia R contém a sequência Arg-Arg-Gly-*Ala*-Ile, que corresponde à sequência de consenso para a fosforilação, exceto pela presença de alanina em lugar da serina. No complexo R_2C_2, essa *sequência de pseudossubstrato* de R ocupa o sítio catalítico de C, impedindo, assim, a entrada de substratos proteicos (ver Figura 10.17). A ligação do cAMP às cadeias R move alostericamente as sequências do pseudossubstrato para fora dos sítios catalíticos. As cadeias C liberadas ficam então livres para se ligarem a substratos de proteínas e fosforilá-los.

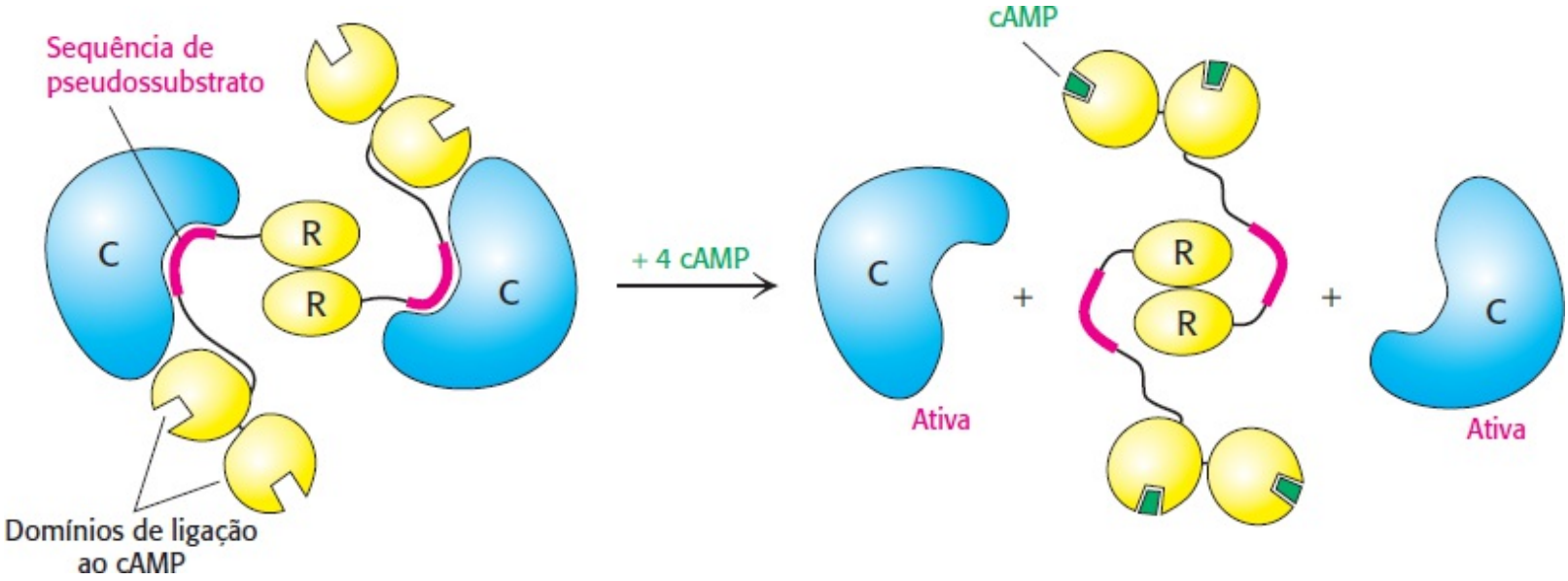


Figura 10.17 Regulação da proteína quinase A. A ligação de quatro moléculas de cAMP ativa a proteína quinase A ao dissociar a holoenzima inibida (R_2C_2) em uma subunidade reguladora (R_2) e duas subunidades cataliticamente ativas (C). Cada cadeia R inclui domínios de ligação do cAMP e uma sequência de pseudossubstrato.

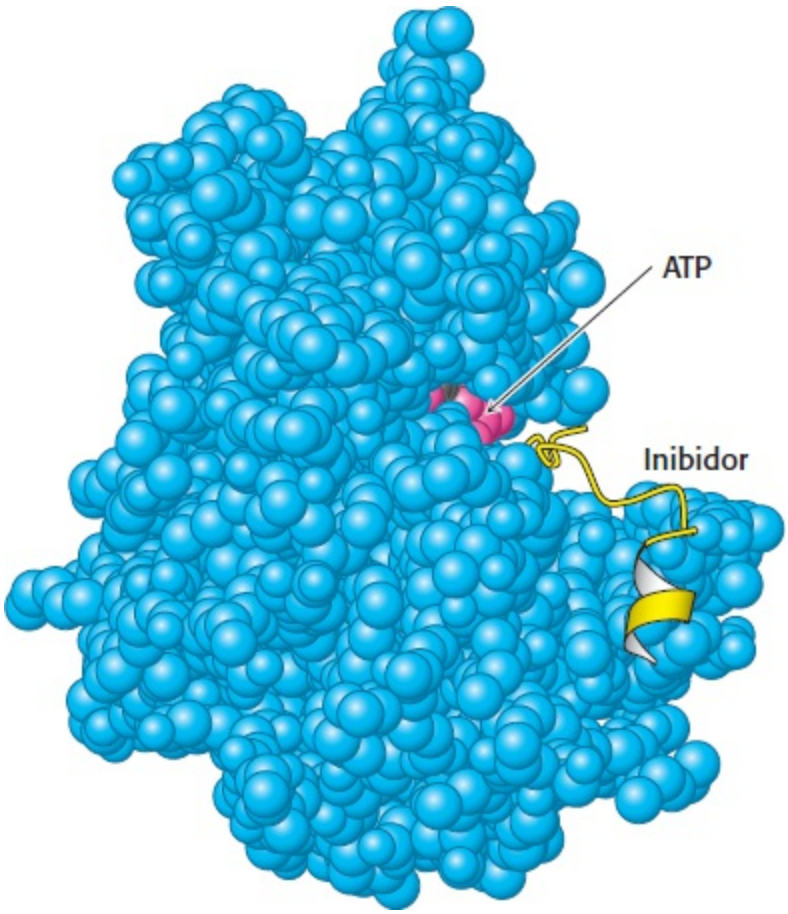


Figura 10.18 Proteína quinase A ligada a um inibidor. Esse modelo de preenchimento espacial mostra um complexo da subunidade catalítica da proteína quinase A com um inibidor apresentando uma sequência de pseudossubstrato. *Observe* que o inibidor (em amarelo) liga-se ao sítio ativo, que consiste em uma fenda entre os domínios da enzima. O ATP ligado, mostrado em vermelho, encontra-se no sítio ativo adjacente ao sítio ao qual está ligado o inibidor. [Desenhada a partir de 1ATP.pdb.]

O ATP e a proteína-alvo ligam-se a uma fenda profunda na subunidade catalítica da proteína quinase A

A cristalografia de raios X revelou a estrutura tridimensional da subunidade catalítica da PKA ligada ao ATP e a um inibidor peptídico de 20 resíduos. A subunidade catalítica de 350 resíduos da PKA tem dois lobos (Figura 10.18). O ATP e parte do inibidor ocupam uma fenda profunda entre os lobos. O lobo menor estabelece muitos contatos com ATP-Mg^{2+}, enquanto o lobo maior liga-se ao peptídio e contribui com os resíduos catalíticos essenciais. A exemplo de outras quinases, os dois lobos aproximam-se um do outro com a ligação do substrato; os mecanismos que restringem o fechamento desse domínio fornecem um meio de regular a atividade da proteína quinase. *A estrutura da PKA tem amplo significado, visto que os resíduos 40 a 280 constituem um cerne catalítico conservado, que é comum a praticamente todas as proteínas quinases conhecidas.* Vemos aqui um exemplo de uma solução bioquímica bem-sucedida para um problema (neste caso, a fosforilação de proteínas), que foi empregada numerosas vezes no curso da evolução.

O peptídio ligado nesse cristal ocupa o sítio ativo, visto que ele contém a sequência de pseudossubstrato Arg-Arg-Asn-*Ala*-Ile (Figura 10.19). A estrutura do complexo revela as interações pelas quais a enzima reconhece a sequência de consenso. O grupo guanidínio do primeiro resíduo de arginina forma um par iônico com a cadeia lateral de carboxilato de um resíduo de glutamato (Glu 127) da enzima. A segunda arginina também interage com dois outros grupos de carboxilato. A cadeia lateral apolar da isoleucina, que corresponde ao Z na sequência de consenso (p. 301), encaixa-se confortavelmente em um sulco hidrofóbico formado por dois resíduos de leucina da enzima.

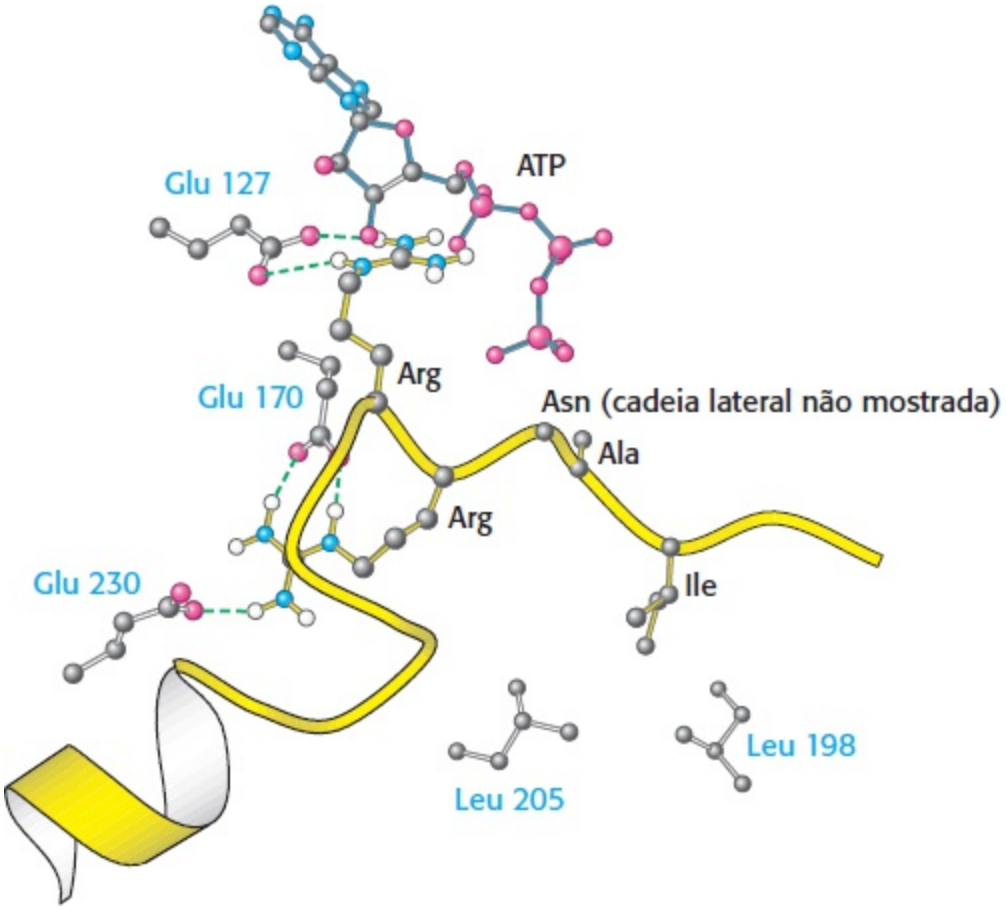


Figura 10.19 Ligação do pseudossubstrato à proteína quinase A. *Observe* que o inibidor estabelece múltiplos contatos com a enzima. As duas cadeias laterais de arginina do pseudossubstrato formam pontes salinas com três grupos de carboxilato do glutamato. As interações hidrofóbicas também são importantes no reconhecimento do substrato. O resíduo de isoleucina do pseudossubstrato está em contato com um par de resíduos de leucina da enzima.

10.4 Muitas enzimas são ativadas por clivagem proteolítica específica

Analisemos agora um mecanismo diferente de regulação enzimática. Muitas enzimas adquirem uma atividade enzimática completa quando se enovelam espontaneamente em suas formas tridimensionais características. Em contrapartida, as formas enoveladas de outras enzimas são inativas até ocorrer a clivagem de uma ou mais ligações peptídicas específicas. O precursor inativo é denominado *zimogênio* ou *proenzima.* Não há necessidade de fonte de energia, como o ATP, para a clivagem. Por conseguinte, diferentemente da regulação reversível pela fosforilação, até mesmo proteínas localizadas fora das células podem ser ativadas por esse mecanismo. Outra diferença notável é que a ativação proteolítica, ao contrário do controle alostérico e da modificação covalente reversível, só ocorre uma vez na vida de uma molécula enzimática.

Tabela 10.3 Zimogênios do estômago e do pâncreas.

Local de síntese	Zimogênio	Enzima ativa
Estômago	Pepsinogênio	Pepsina
Pâncreas	Quimiotripsinogênio	Quimiotripsina
Pâncreas	Tripsinogênio	Tripsina
Pâncreas	Procarboxipeptidase	Carboxipeptidase

A proteólise específica constitui um meio comum de ativar enzimas e outras proteínas em sistemas biológicos. Por exemplo:

1. As *enzimas digestivas* que hidrolisam proteínas são sintetizadas como zimogênios no estômago e no pâncreas (Tabela 10.3).

2. *A coagulação do sangue* é mediada por uma cascata de ativações proteolíticas, que assegura uma resposta ao traumatismo rápida e amplificada.

3. Alguns hormônios proteicos são sintetizados como precursores inativos. Por exemplo, a *insulina* é derivada da proinsulina pela remoção proteolítica de um peptídio.

4. A proteína fibrosa *colágeno,* que é o principal constituinte da pele e dos ossos, deriva do *procolágeno,* um precursor solúvel.

5. Muitos *processos de desenvolvimento* são controlados pela ativação de zimogênios. Por exemplo, na metamorfose de um girino em uma rã, grandes quantidades de colágeno são reabsorvidas da cauda no decorrer de poucos dias. De modo semelhante, uma grande quantidade de colágeno é degradada no útero de mamífero após o parto. A conversão da *procolagenase* em *colagenase,* a protease ativa, é precisamente cronometrada nesses processos de remodelagem.

6. A *morte celular programada* ou *apoptose* é mediada por enzimas proteolíticas, denominadas

caspases, que são sintetizadas na forma precursora de *procaspases*. Quando ativadas por vários sinais, as caspases atuam causando morte celular na maioria dos organismos, desde *C. elegans* aos seres humanos. A apoptose fornece um meio de esculpir as formas das partes do corpo durante o desenvolvimento, bem como um meio de eliminar as células danificadas ou infectadas.

A seguir, examinaremos a ativação e o controle dos zimogênios, utilizando como exemplos várias enzimas digestivas, assim como a formação do coágulo sanguíneo.

O quimiotripsinogênio é ativado por clivagem específica de uma única ligação peptídica

A *quimiotripsina* é uma enzima digestiva que hidrolisa proteínas no intestino delgado. Seu mecanismo de ação foi descrito de modo detalhado no Capítulo 9. Seu precursor inativo, o *quimiotripsinogênio,* é sintetizado no pâncreas, assim como vários outros zimogênios e enzimas digestivas. Na verdade, o pâncreas é um dos órgãos mais ativos na síntese e secreção de proteínas. As enzimas e os zimogênios são sintetizados nas células acinares do pâncreas e armazenados dentro de grânulos delimitados por membrana (Figura 10.20). Os grânulos de zimogênio acumulam-se no ápice da célula acinar. Quando a célula é estimulada por um sinal hormonal ou por um impulso nervoso, o conteúdo dos grânulos é liberado em um ducto que leva ao duodeno.

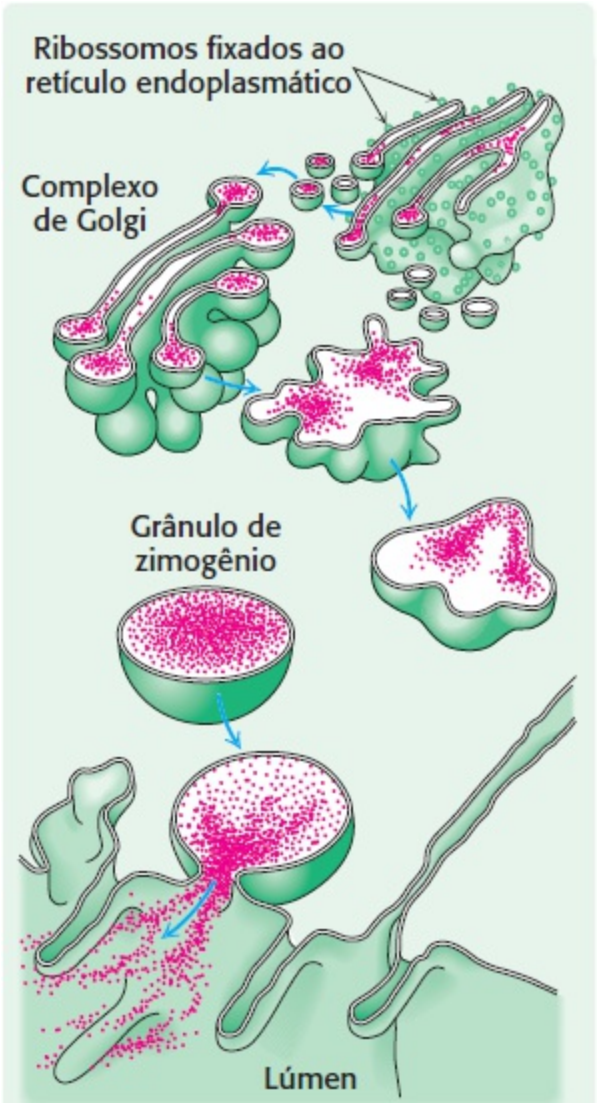


Figura 10.20 Secreção de zimogênios por uma célula acinar do pâncreas. Os zimogênios são sintetizados em ribossomos ligados ao retículo endoplasmático. Subsequentemente, são processados no aparelho de Golgi e

acondicionados em grânulos de zimogênio ou secretores. Com o sinal apropriado, os grânulos fundem-se com a membrana plasmática e descarregam seu conteúdo no lúmen dos ductos pancreáticos. O citoplasma da célula é mostrado em verde-claro. As membranas e o lúmen são mostrados em verde escuro.

O quimiotripsinogênio, uma cadeia polipeptídica simples constituída de 245 resíduos de aminoácidos, é praticamente desprovido de atividade enzimática. É convertido em uma enzima totalmente ativa quando a ligação peptídica que une a arginina 15 e a isoleucina 16 é clivada pela tripsina (Figura 10.21). A enzima ativa resultante, denominada quimiotripsina π, atua então sobre outras moléculas de quimiotripsina π, removendo dois dipeptídios para produzir a quimiotripsina α, a forma estável da enzima. As três cadeias resultantes da quimiotripsina α permanecem ligadas umas às outras por duas ligações de dissulfeto entre cadeias. A característica notável desse processo de ativação é que *a clivagem de uma única ligação peptídica específica transforma a proteína, de uma forma cataliticamente inativa em uma forma totalmente ativa.*

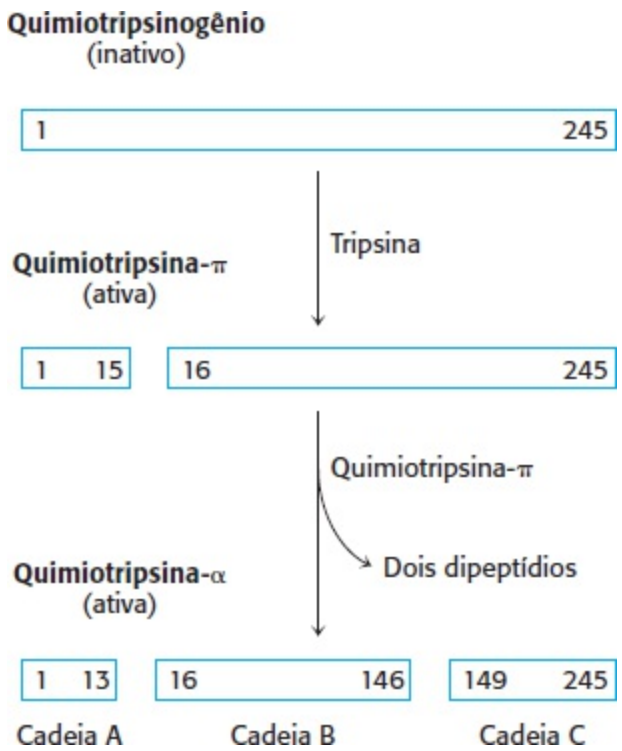


Figura 10.21 Ativação proteolítica do quimiotripsinogênio. As três cadeias da quimiotripsina α estão ligadas por duas pontes de dissulfeto entre cadeias (A para B, e B para C).

A ativação proteolítica do quimiotripsinogênio leva à formação de um sítio de ligação de substrato

Como a clivagem de uma única ligação peptídica ativa o zimogênio? A clivagem da ligação peptídica entre os aminoácidos 15 e 16 desencadeia mudanças conformacionais-chave, que foram reveladas pela elucidação da estrutura tridimensional do quimiotripsinogênio.

1. O recém-formado *grupo aminoterminal da isoleucina 16 volta-se para dentro e forma uma ligação iônica com o aspartato 194* no interior da molécula de quimiotripsina (Figura 10.22).

2. Essa interação eletrostática desencadeia uma série de mudanças conformacionais. A metionina 192 desloca-se de uma posição profundamente mergulhada no zimogênio para a superfície da enzima

ativa, enquanto os resíduos 187 e 193 afastam-se um do outro. Essas alterações resultam na formação do *sítio de especificidade do substrato* para grupos aromáticos e apolares volumosos. Um lado desse sítio é constituído pelos resíduos 189 a 192. *Essa cavidade para a ligação de parte do substrato não está totalmente formada no zimogênio.*

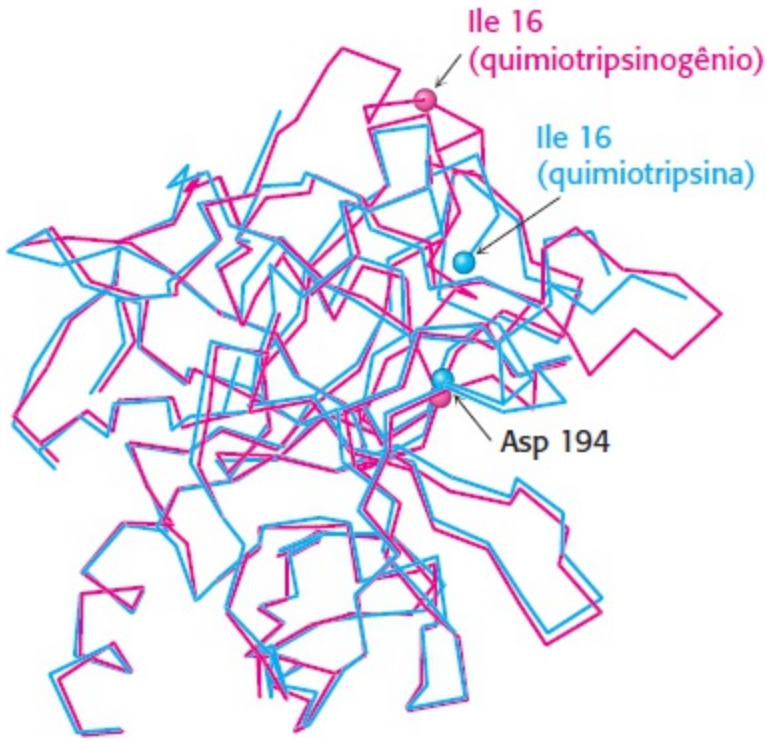


Figura 10.22 Conformações do quimiotripsinogênio (em vermelho) e da quimiotripsina (em azul). *Observe* a alteração da posição da isoleucina 16 na quimiotripsina. A interação eletrostática entre o grupo α-amino da isoleucina 16 e o carboxilato do aspartato 194, essencial para a estrutura da quimiotripsina ativa, só é possível na quimiotripsina. [Desenhada a partir de 1GCT.pdb e 2GCA.pdb.]

3. O estado de transição tetraédrico na catálise pela quimiotripsina é estabilizado por pontes de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da carbonila de carga negativa do substrato e dois grupos NH da cadeia principal da enzima (ver Figura 9.8). Um desses grupos NH não está adequadamente localizado no quimiotripsinogênio, de modo que a *cavidade do oxiânion é incompleta no zimogênio.*

4. As mudanças de conformação em outros locais da molécula são muito pequenas. Por conseguinte, *a atividade enzimática em uma proteína pode ser acionada por mudanças conformacionais discretas e altamente localizadas, que são deflagradas pela hidrólise de uma ligação peptídica.*

A produção de tripsina a partir do tripsinogênio leva à ativação de outros zimogênios

As alterações estruturais que acompanham a ativação do *tripsinogênio,* o precursor da enzima proteolítica *tripsina,* diferem ligeiramente daquelas observadas na ativação do quimiotripsinogênio. Análises de cristalografia de raios X demonstraram que a conformação de quatro segmentos do polipeptídio, que constituem cerca de 15% da molécula, modifica-se acentuadamente na ativação. *Essas regiões são muito flexíveis no zimogênio, enquanto exibem uma conformação bem definida na tripsina.* Além disso, a cavidade do oxiânion no tripsinogênio está muito distante da histidina 57 para promover a formação do estado de transição tetraédrico.

A digestão de proteínas no duodeno exige a ação concomitante de várias enzimas proteolíticas,

visto que cada uma delas é específica para um número limitado de cadeias laterais. Por conseguinte, os zimogênios precisam ser ativados ao mesmo tempo. O controle coordenado é obtido pela ação da *tripsina como ativador comum de todos os zimogênios pancreáticos* – o tripsinogênio, o quimiotripsinogênio, a proelastase, a procarboxipeptidase e a prolipase, uma enzima de degradação dos lipídios. Para produzir a tripsina ativa, as células que revestem o duodeno secretam uma enzima, a *enteropeptidase,* que hidrolisa uma ligação peptídica única lisina-isoleucina específica no tripsinogênio, à medida que o zimogênio proveniente do pâncreas entra no duodeno. A pequena quantidade de tripsina produzida dessa maneira ativa mais tripsinogênio e os outros zimogênios (Figura 10.23). Por conseguinte, *a formação da tripsina pela enteropeptidase constitui a principal etapa de ativação.*

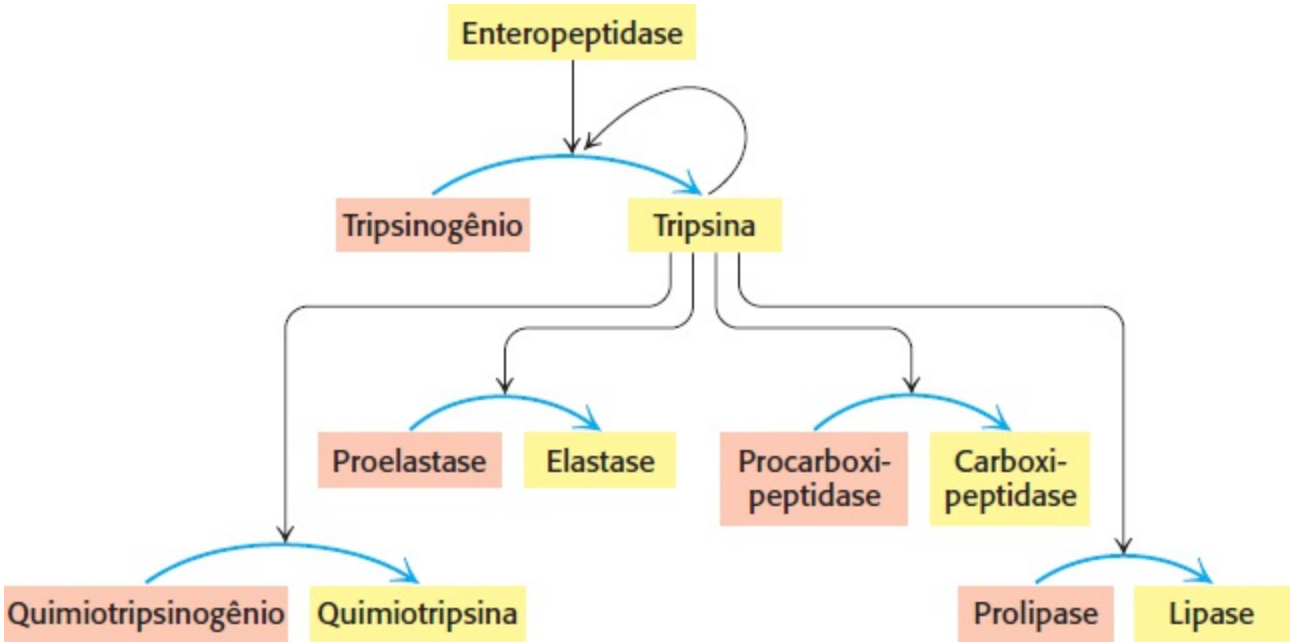


Figura 10.23 Ativação dos zimogênios por clivagem proteolítica. A enteropeptidase inicia a ativação dos zimogênios pancreáticos, ativando a tripsina, que, em seguida, ativa outros zimogênios. As enzimas ativas são mostradas em amarelo, e os zimogênios, em laranja.

Algumas enzimas proteolíticas têm inibidores específicos

A conversão de um zimogênio em uma protease pela clivagem de uma única ligação peptídica constitui um modo preciso de acionar a atividade enzimática. Entretanto, essa etapa de ativação é irreversível, de modo que é necessário um mecanismo diferente para interromper a proteólise. Essa tarefa é executada por inibidores específicos de proteases. Por exemplo, o *inibidor pancreático da tripsina,* uma proteína de 6 kDa, inibe a tripsina ao ligar-se muito firmemente a seu sítio ativo. A constante de dissociação do complexo é de 0,1 pM, o que corresponde a uma energia livre padrão de ligação de cerca de –75 kJ mol^{-1} (–18 kcal mol^{-1}). Diferentemente de quase todas as montagens conhecidas de proteínas, esse complexo não se dissocia em suas cadeias constituintes mediante tratamento com agentes desnaturantes, como ureia 8 M ou hidrocloridrato de guanina 6 M.

A razão para a estabilidade excepcional do complexo é que o inibidor pancreático da tripsina é um análogo de substrato muito efetivo. Análises de cristalografia de raios X mostraram que o inibidor situa-se no sítio ativo da enzima, posicionado de tal modo que a cadeia lateral da lisina 15 desse inibidor interage com a cadeia lateral de aspartato na cavidade de especificidade da tripsina. Além

disso, existem muitas pontes de hidrogênio entre a cadeia principal da tripsina e a de seu inibidor, e o grupo carbonila da lisina 15 e os átomos circundantes do inibidor encaixam-se perfeitamente no sítio ativo da enzima. A comparação da estrutura do inibidor ligado à enzima com a do inibidor livre revela que *a estrutura permanece essencialmente inalterada com a ligação à enzima* (Figura 10.24). Por conseguinte, o inibidor é pré-organizado em uma estrutura altamente complementar com o sítio ativo da enzima. Com efeito, a ligação peptídica entre a lisina 15 e a alanina 16 no inibidor pancreático da tripsina é clivada, porém em uma velocidade muito lenta: a meia-vida do complexo tripsina-inibidor é de vários meses. Em essência, o inibidor é um substrato, porém a sua estrutura intrínseca é tão precisamente complementar ao sítio ativo da enzima que ele se liga muito firmemente, progredindo raramente para o estado de transição, com uma renovação lenta.

A quantidade de tripsina é muito maior que a do inibidor. Por que existe o inibidor da tripsina? Lembre-se de que a tripsina ativa outros zimogênios. Em consequência, é vital impedir que até mesmo pequenas quantidades de tripsina possam inadequadamente iniciar a cascata prematuramente. O inibidor da tripsina liga-se a moléculas de tripsina no pâncreas ou nos ductos pancreáticos. Essa inibição evita a ocorrência de lesão grave desses tecidos, o que poderia levar à pancreatite aguda.

O inibidor pancreático da tripsina não é o único inibidor importante de proteases. A α_1-*antitripsina* (também denominada α_1-*antiproteinase*), uma proteína plasmática de 53 kDa, protege os tecidos contra a digestão pela elastase, um produto de secreção dos neutrófilos (leucócitos que ingerem bactérias). O termo *antielastase* seria uma designação mais acurada para esse inibidor, visto que ele bloqueia a elastase muito mais efetivamente do que a tripsina. À semelhança do inibidor pancreático da tripsina, a α_1-antitripsina bloqueia a ação de enzimas-alvo, ligando-se quase irreversivelmente a seus sítios ativos. Os distúrbios genéticos que levam a uma deficiência de α_1-antitripsina mostram que esse inibidor é fisiologicamente importante. Por exemplo, a substituição do glutamato pela lisina no resíduo 53 no mutante tipo Z diminui a secreção desse inibidor pelas células hepáticas. Os níveis séricos do inibidor correspondem acerca de 15% do valor de referência normal em indivíduos homozigotos para esse defeito. Em consequência, o excesso de elastase destrói as paredes alveolares dos pulmões, digerindo as fibras elásticas e outras proteínas do tecido conjuntivo.

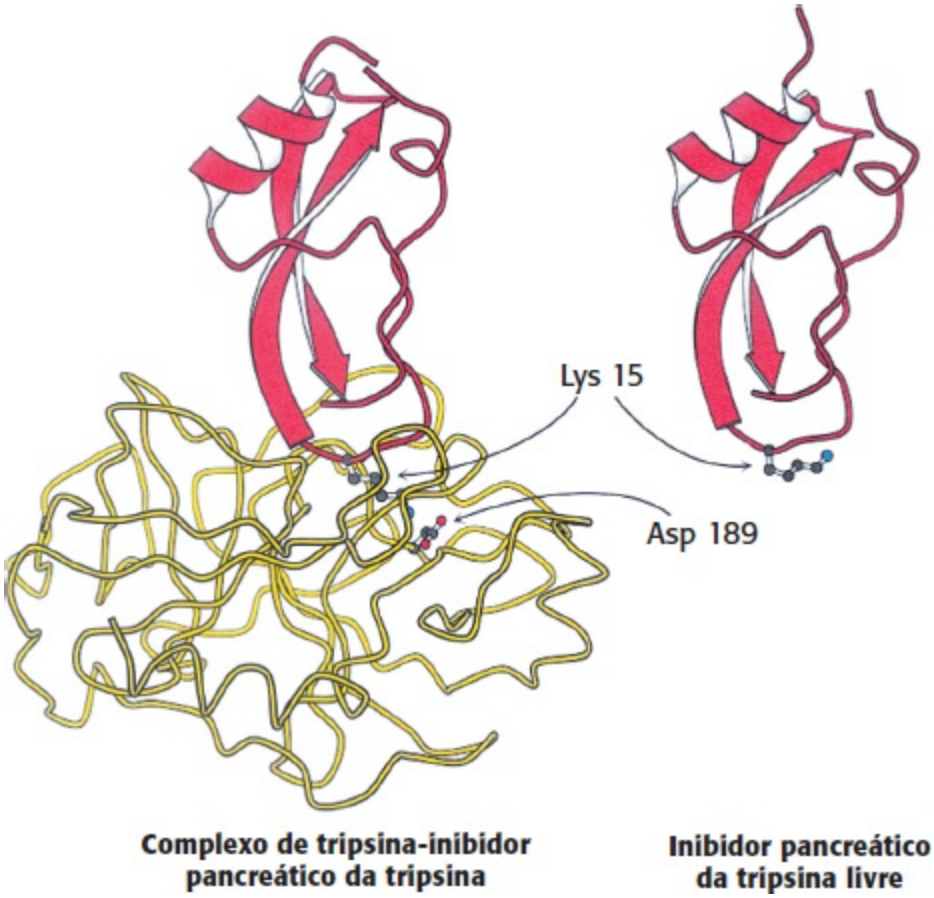


Figura 10.24 Interação da tripsina com o seu inibidor. Estrutura de um complexo de tripsina (em amarelo) com o inibidor pancreático da tripsina (em vermelho). *Observe* que a lisina 15 do inibidor penetra no sítio ativo da enzima. Nesse local, forma uma ponte salina com o aspartato 189 no sítio ativo. *Observe* também que o inibidor ligado e o inibidor livre apresentam uma estrutura quase idêntica. [Desenhada a partir de 1BPI.pdb.]

A condição clínica resultante é denominada *enfisema* (também conhecida como *doença pulmonar destrutiva*). Os indivíduos com enfisema precisam respirar mais fortemente do que as pessoas normais para trocar o mesmo volume de ar, visto que seus alvéolos são muito menos resilientes do que o normal. O tabagismo aumenta acentuadamente a probabilidade de desenvolvimento de enfisema mesmo em um heterozigoto do tipo Z. A razão é que a fumaça oxida a metionina 358 do inibidor (Figura 10.25), um resíduo essencial para a ligação da elastase. Com efeito, essa cadeia lateral de metionina constitui a isca que captura seletivamente a elastase. Por outro lado, o produto de oxidação, o *sulfóxido de metionina,* não atrai a elastase, o que representa uma consequência notável da inserção de apenas um átomo de oxigênio em uma proteína, bem como um exemplo marcante do efeito do comportamento na bioquímica. Consideraremos outro inibidor da protease, a antitrombina III, quando examinarmos o controle da coagulação sanguínea.

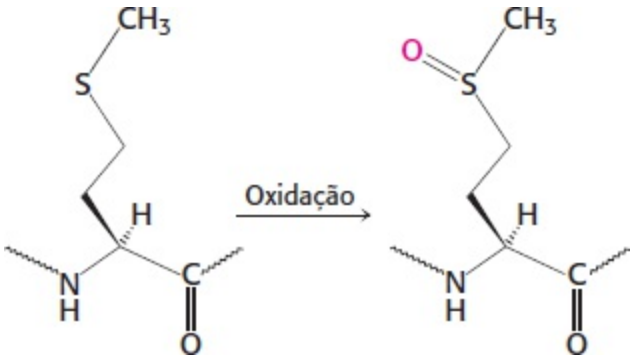


Figura 10.25 Oxidação da metionina a sulfóxido de metionina.

A coagulação sanguínea ocorre por meio de uma cascata de ativações de zimogênios

As *cascatas enzimáticas* são frequentemente utilizadas nos sistemas bioquímicos para obter uma resposta rápida. Em uma cascata, um sinal inicial desencadeia uma série de etapas, e cada uma é catalisada por uma enzima. Em cada etapa, o sinal é amplificado. Por exemplo, se uma molécula sinalizadora ativar uma enzima que, por sua vez, ativa 10 enzimas, e cada uma dessas 10 enzimas ativa, por sua vez, 10 enzimas adicionais, depois de quatro etapas, o sinal original terá sido amplificado 10.000 vezes. Os coágulos sanguíneos são formados por uma *cascata de ativações de zimogênios:* a forma ativada de um fator da coagulação catalisa a ativação do seguinte (Figura 10.26). Assim, quantidades muito pequenas dos fatores iniciais são suficientes para deflagrar a cascata, assegurando uma resposta rápida ao traumatismo.

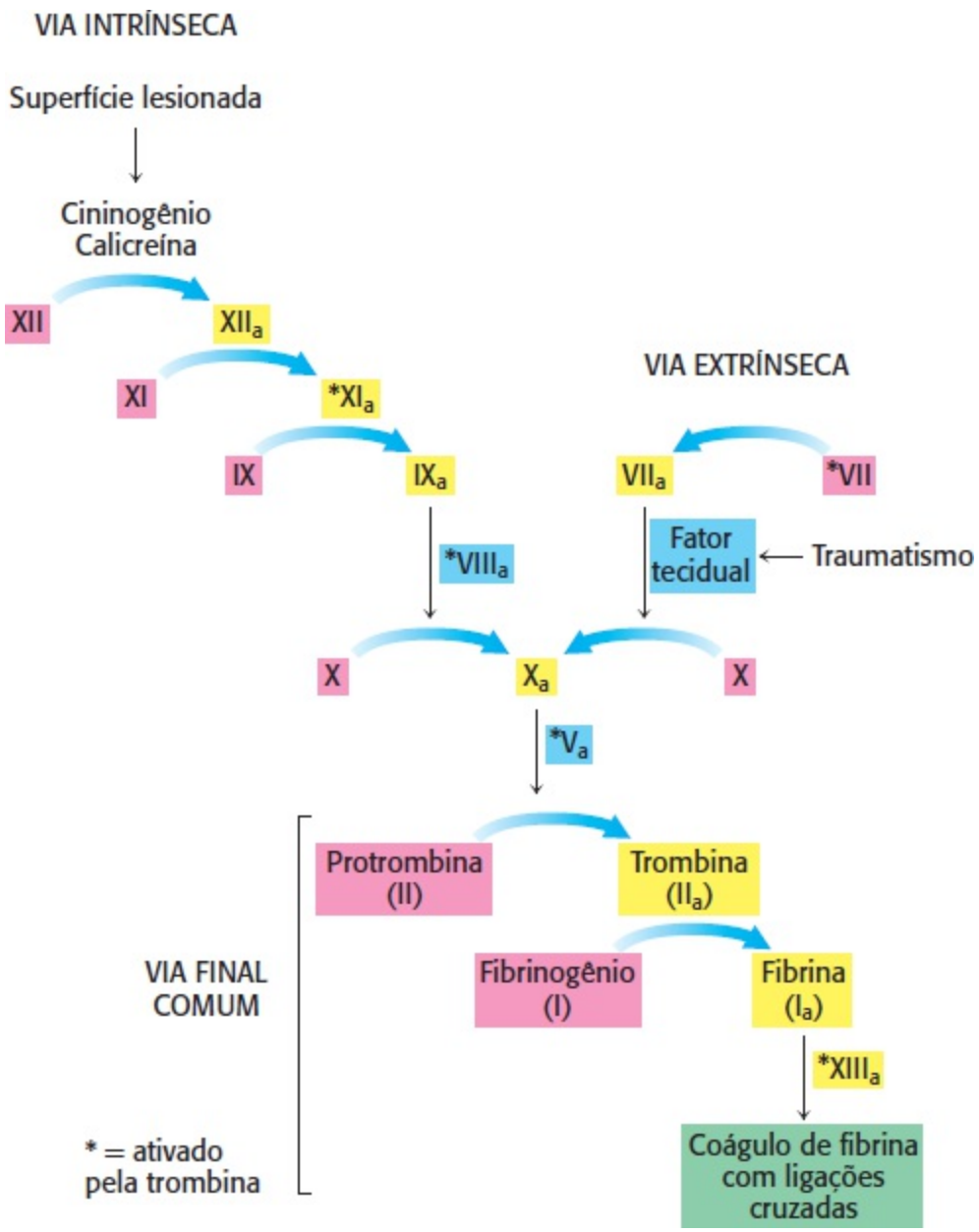


Figura 10.26 Cascata da coagulação sanguínea. Forma-se um coágulo de fibrina pela interação das vias intrínseca, extrínseca e final comum. A via intrínseca começa com a ativação do fator XII (fator Hageman) em consequência do contato com superfícies anormais produzidas pela lesão. A via extrínseca é desencadeada pela ocorrência de traumatismo, liberando o fator tecidual (FT). O FT forma um complexo com o fator VII, dando início a uma cascata de ativação da

trombina. As formas inativas dos fatores da coagulação são mostradas em vermelho, e seus correspondentes ativados (indicados pelo subscrito "a"), em amarelo. As proteínas estimuladoras, que não são elas próprias enzimas, estão mostradas em caixas azuis. Uma característica notável desse processo é que a forma ativada de um fator da coagulação catalisa a ativação do fator seguinte.

Foram descritos dois modos de iniciação da coagulação sanguínea: a *via intrínseca* e a *via extrínseca*. A via intrínseca da coagulação é ativada pela exposição de superfícies aniônicas quando ocorre ruptura do revestimento endotelial dos vasos sanguíneos. A via extrínseca, que parece ser mais crucial na coagulação sanguínea, é iniciada quando o traumatismo expõe o *fator tecidual* (FT), uma glicoproteína integral de membrana. Pouco depois da exposição do fator tecidual, são produzidas pequenas quantidades de *trombina,* a protease essencial da coagulação. Em seguida, a trombina amplifica o processo de coagulação ao ativar enzimas e fatores que levam à produção de mais trombina, fornecendo um exemplo de retroalimentação positiva. As vias extrínseca e intrínseca convergem para uma sequência comum de etapas finais para formar um coágulo composto da proteína fibrina (Figura 10.26). Observe que as formas ativas dos fatores da coagulação são designadas por um subscrito "a", enquanto os fatores que são ativados pela trombina são designados com um asterisco.

O fibrinogênio é convertido pela trombina em um coágulo de fibrina

A parte mais bem caracterizada do processo da coagulação é a etapa final da cascata: a conversão do *fibrinogênio* em fibrina pela trombina, uma enzima proteolítica. O fibrinogênio é constituído de três unidades globulares conectadas por dois bastonetes (Figura 10.27). Essa proteína de 340 kDa consiste em seis cadeias: duas de cada Aα, Bβ e γ. As regiões dos bastões consistem em espirais α-helicoidais de três fitas, um tema recorrente nas proteínas (Seção 2.3). A trombina cliva quatro *ligações peptídicas arginina-glicina* na região globular central do fibrinogênio. Com a clivagem, ocorre liberação de um peptídio A de 18 resíduos de cada uma das duas cadeias Aα, bem como um peptídio B de 20 resíduos de cada uma das duas cadeias Bβ. Esses peptídios A e B são denominados *fibrinopeptídios*. Uma molécula de fibrinogênio desprovida desses fibrinopeptídios é denominada *monômero de fibrina* e apresenta a estrutura de subunidades $(\alpha\beta\gamma)_2$.

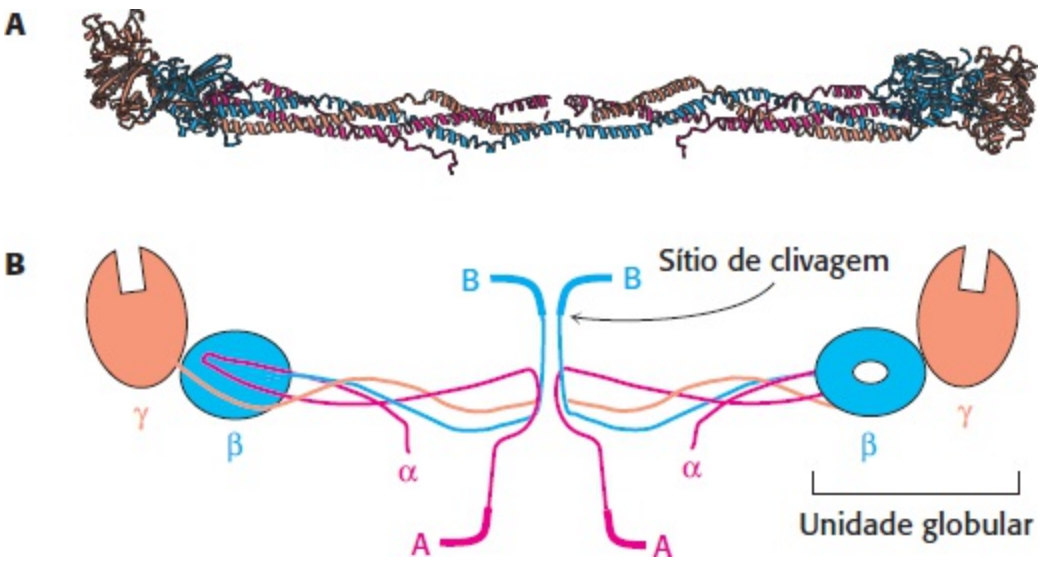


Figura 10.27 Estrutura de uma molécula de fibrinogênio. A. Esquema em fitas. As duas regiões em bastonete consistem em espirais α-helicoidais, conectadas a uma região globular em cada extremidade. A estrutura da região

globular central não foi determinada. **B.** Representação esquemática mostrando as posições dos fibrinopeptídios A e B. [Parte A desenhada a partir de 1 DEQ.pdb.]

Os monômeros de fibrina organizam-se espontaneamente em arranjos fibrosos ordenados, denominados *fibrina*. As micrografias eletrônicas e os padrões de cristalografia de raios X de baixo ângulo mostram que a fibrina tem uma estrutura periódica, com repetições a cada 23 nm (Figura 10.28). As imagens de alta resolução revelam como a remoção dos fibrinopeptídios possibilita a reunião dos monômeros de fibrina para formar a fibrina. As cadeias homólogas β e apresentam domínios globulares nas extremidades carboxiterminais (Figura 10.29). Esses domínios têm "cavidades" de ligação, que interagem com peptídios. O domínio B é específico para sequências da forma H_3N^+Gly -His-Arg-, enquanto o domínio γ liga-se a H_3N^+Gly- Pro-Arg. Exatamente essas sequências (algumas vezes designadas como "*knobs*" ou protuberâncias) são expostas nas extremidades aminoterminais das cadeias β e α, respectivamente, após a clivagem pela trombina. As *protuberâncias* das subunidades α encaixam-se nas cavidades das subunidades de outro monômero, formando uma protofibrila. Essa protofibrila se estende quando as protuberâncias das subunidades β se encaixam nas cavidades das subunidades β de outras protofibrilas. Por conseguinte, de modo análogo à ativação do quimiotripsinogênio, a clivagem da ligação peptídica expõe novas extremidades aminoterminais, que podem participar em interações específicas. O "coágulo mole" recém-formado é estabilizado pela formação de ligações amídicas entre as cadeias laterais dos resíduos de lisina e glutamina em monômeros diferentes.

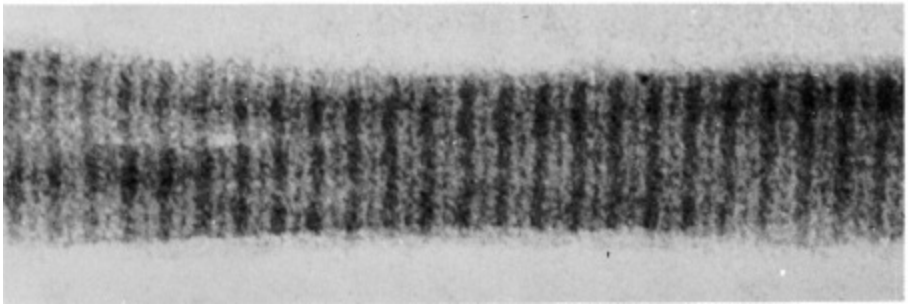
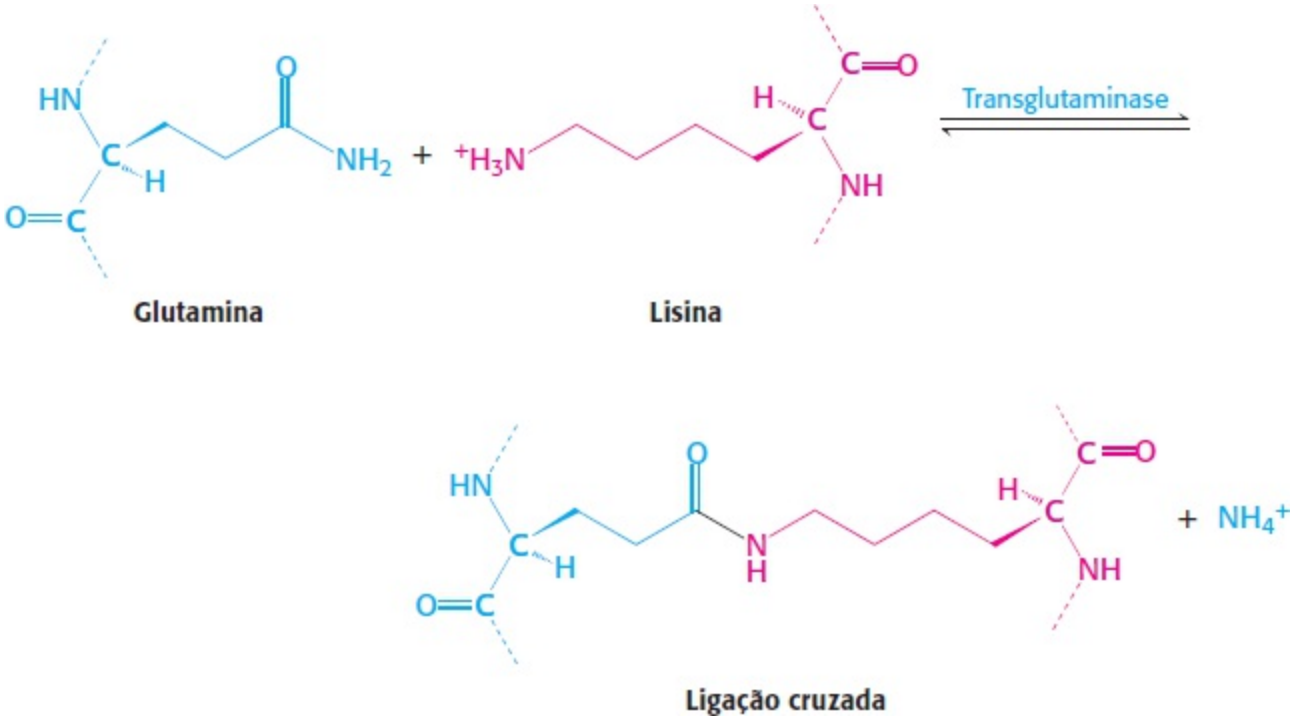


Figura 10.28 Micrografia eletrônica da fibrina. O período de 23 nm ao longo do eixo da fibra é metade do comprimento de uma molécula de fibrinogênio. [Cortesia do Dr. Henry Slayter.]



Essa reação de ligação cruzada é catalisada pela *transglutaminase* (*fator XIII$_a$*), que é, ela própria, ativada a partir da forma protransglutaminase pela trombina.

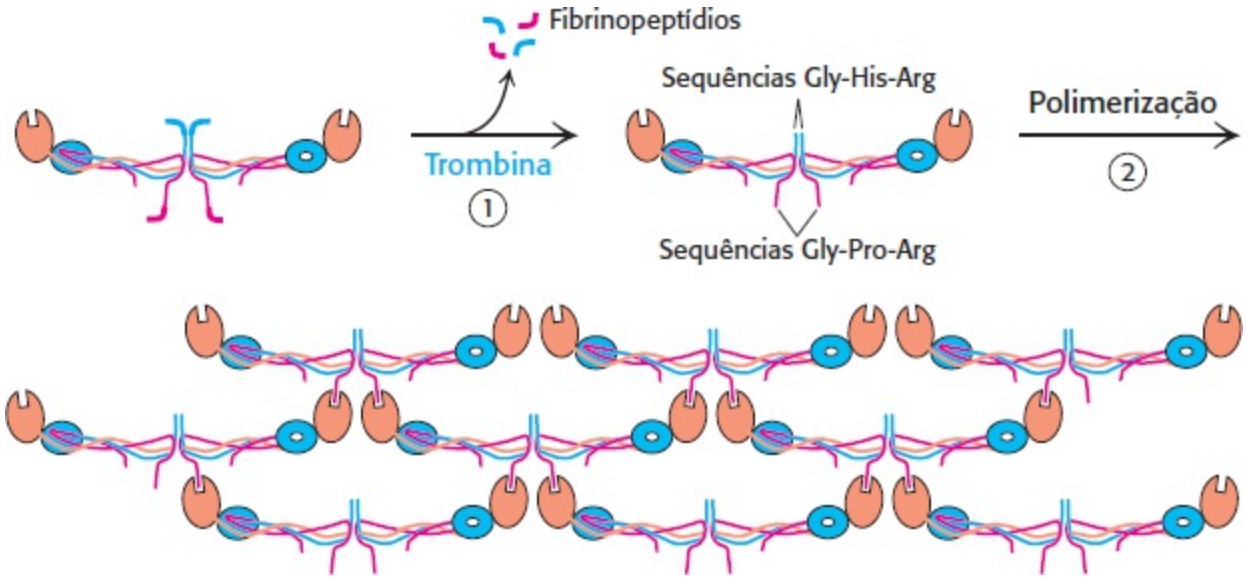


Figura 10.29 Formação de um coágulo de fibrina. **1**. A trombina cliva os fibrinopeptídios A e B do glóbulo central do fibrinogênio. **2.** Os domínios globulares nas extremidades carboxiterminais das cadeias β e interagem com "protuberâncias" expostos nas extremidades aminoterminais das cadeias β e γ, formando coágulos.

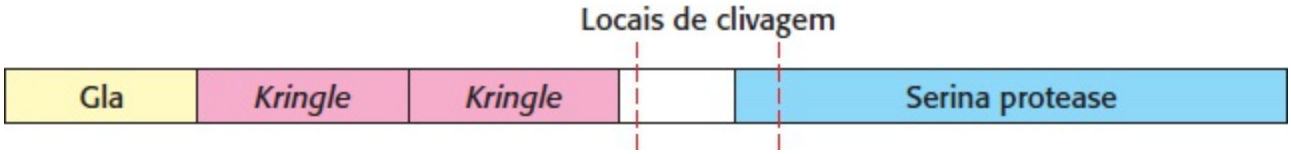


Figura 10.30 Estrutura modular da protrombina. A clivagem de duas ligações peptídicas produz a trombina. Todos os resíduos de γ-carboxiglutamato estão no domínio gla.

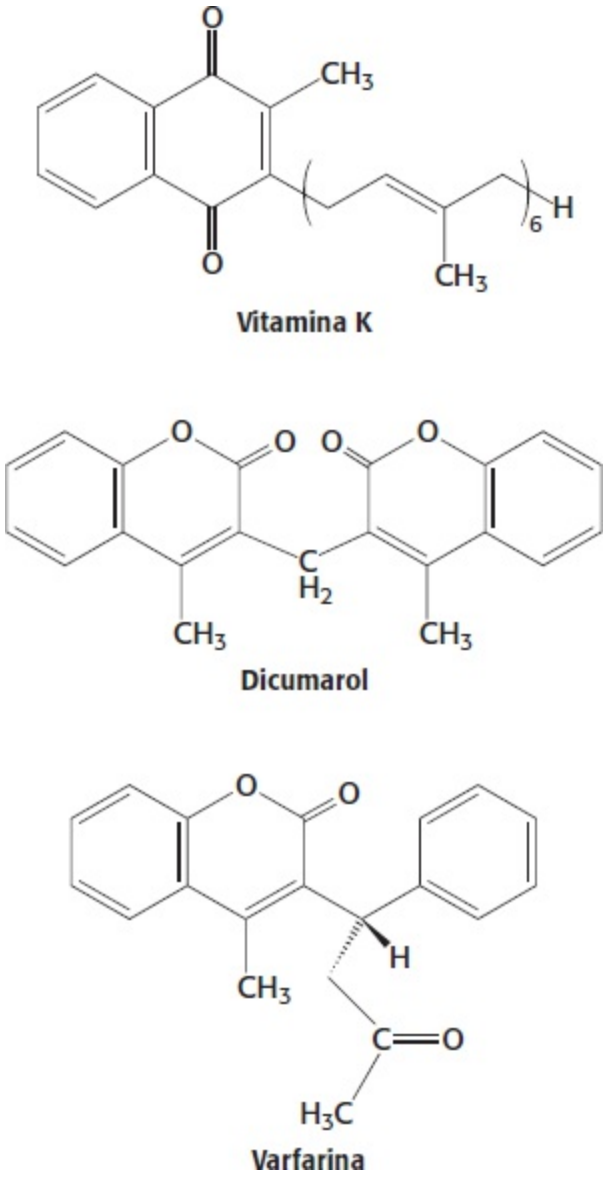


Figura 10.31 **Estruturas da vitamina K e de dois antagonistas, o dicumarol e a varfarina.**

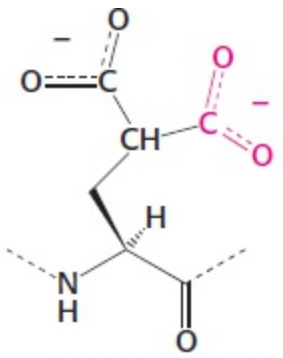
A protrombina é preparada para ativação por meio de uma modificação dependente de vitamina K

A trombina é sintetizada na forma de um zimogênio, denominado *protrombina.* A molécula inativa apresenta quatro domínios principais, com o domínio de serina protease na extremidade carboxiterminal. O primeiro domínio é denominado *domínio gla* (um domínio rico em γ-carboxiglutamato), enquanto o segundo e o terceiro domínios são denominados *domínios kringle* (em homenagem a um produto dinamarquês de pastelaria com ao qual se assemelham; Figura 10.30). Esses domínios atuam em conjunto para manter a protrombina em uma forma inativa e para direcioná-la aos locais apropriados para a sua ativação pelo fator X_a (uma serina protease) e pelo fator V_3 (uma proteína estimuladora). A ativação é iniciada pela clivagem proteolítica da ligação entre a arginina 274 e a treonina 275, liberando um fragmento que contém os primeiros três domínios. A clivagem da ligação entre a arginina 323 e a isoleucina 324 (análoga à ligação essencial no quimiotripsinogênio) produz a trombina ativa.

A vitamina K (Figura 10.31) era conhecida há muitos anos por ser essencial na síntese da protrombina e de vários outros fatores da coagulação. Com efeito, é denominada vitamina K

porque a deficiência dessa enzima resulta em defeito da coagulação (de *koagulation*, palavra escandinava) sanguínea. Os resultados de estudos da protrombina anormal, sintetizada na ausência de vitamina K ou na presença de antagonistas da vitamina K, como o dicumarol, revelaram a importância dessa vitamina na formação adequada dos coágulos. O *dicumarol* é encontrado no trevo doce em decomposição e provoca uma doença hemorrágica fatal no gado alimentado com esse feno. Esse derivado da cumarina é utilizado clinicamente como *anticoagulante* para evitar tromboses em pacientes propensos à formação de coágulos. O dicumarol e outros antagonistas da vitamina K relacionados, como a *varfarina,* também atuam como raticidas efetivos. As vacas alimentadas com dicumarol sintetizam uma protrombina anormal, que não se liga ao Ca^{2+}, diferentemente da protrombina normal. Essa diferença representou um enigma durante algum tempo, visto que a protrombina anormal apresenta o mesmo número de resíduos de aminoácidos que a protrombina normal e fornece a mesma análise de aminoácidos após hidrólise ácida.

Estudos de ressonância magnética nuclear revelaram que a protrombina normal contém -*carboxiglutamato,* um resíduo anteriormente desconhecido, que escapava à detecção em virtude da perda do segundo grupo carboxila com a hidrólise ácida durante a análise de aminoácidos. A protrombina anormal formada após a administração de anticoagulantes carece desse aminoácido modificado. Com efeito, os primeiros 10 resíduos de glutamato na região aminoterminal da protrombina são carboxilados a γ-carboxiglutamato por um sistema enzimático dependente de vitamina K (Figura 10.32). *A reação de carboxilação dependente de vitamina K converte o glutamato, um quelante fraco de Ca^{2+}, em γ-carboxiglutamato, um quelante muito mais poderoso.* Por conseguinte, a protrombina é capaz de se ligar ao Ca^{2+}; todavia, qual é o efeito dessa ligação? A ligação do Ca^{2+} à protrombina ancora o zimogênio às membranas fosfolipídicas derivadas das plaquetas sanguíneas após a ocorrência de lesão. A ligação da protrombina a superfícies fosfolipídicas é crucial, visto que a traz em íntima proximidade com duas proteínas da coagulação, que catalisam a sua conversão em trombina. O domínio de ligação do cálcio é removido durante a ativação, liberando a trombina da membrana de modo que possa clivar o fibrinogênio e outros alvos.



Resíduo γ-carboxiglutamato

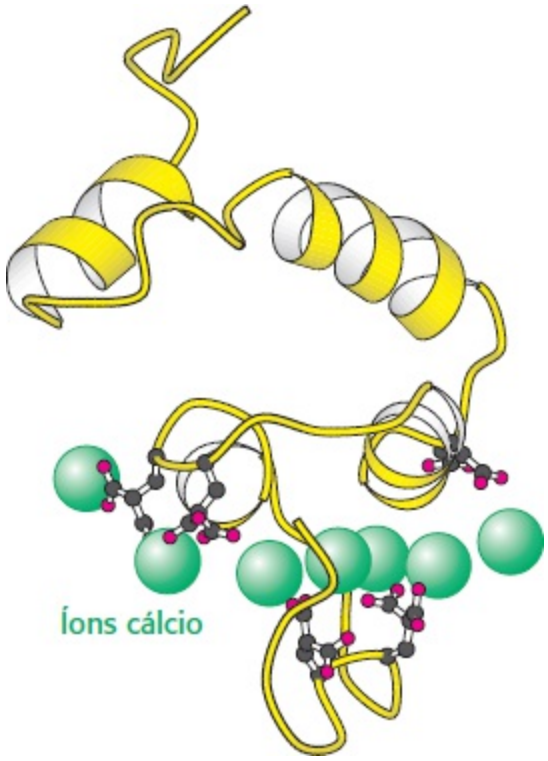


Figura 10.32 A região de ligação do cálcio da protrombina. A protrombina liga-se aos íons cálcio por meio do aminoácido modificado, o γ-carboxiglutamato (em vermelho). [Desenhada a partir de 2PF2.pdb.]

A hemofilia revelou uma etapa inicial no processo de coagulação

Alguns avanços importantes na elucidação das vias da coagulação vieram de estudos de pacientes com distúrbios hemorrágicos. A *hemofilia clássica* ou *hemofilia A* é o defeito da coagulação mais bem conhecido. Esse distúrbio é geneticamente transmitido como caráter recessivo ligado ao cromossomo X. *Na hemofilia clássica, o fator VIII (fator anti-hemofílico) da via intrínseca está ausente ou tem a sua atividade acentuadamente reduzida.* Embora o fator VIII não seja em si uma protease, ele estimula acentuadamente a ativação do fator X, a protease final da via intrínseca, pelo fator IX_a, uma serina protease (Figura 10.33). Por conseguinte, a ativação da via intrínseca está gravemente comprometida na hemofilia.

No passado, os hemofílicos eram tratados com transfusões de uma fração de plasma concentrado contendo fator VIII. Essa terapia estava associada ao risco de infecção. Com efeito, muitos hemofílicos contraíram hepatite e, mais recentemente, AIDS. Havia uma necessidade urgente de uma fonte mais segura de fator VIII. Com o uso das técnicas de purificação bioquímica e DNA recombinante, o gene do fator VIII foi isolado e expresso em células crescendo em cultura. O fator VIII recombinante purificado a partir dessas células substituiu, em grande parte, os concentrados de plasma no tratamento da hemofilia.

Relato de uma disposição hemorrágica observada em certas famílias

"Há cerca de setenta ou oitenta anos, uma mulher com o nome de Smith estabeleceuse na vizinhança de Plymouth, New Hampshire, e transmitiu a seguinte idiossincrasia a seus descendentes. Como ela observou, trata-se de uma idiossincrasia à qual sua família está infelizmente sujeita e que tem sido a fonte não apenas de grandes cuidados, mas também frequentemente a causa de morte. Se o menor arranhão for feito na pele de alguns desses indivíduos, uma hemorragia mortal acabará ocorrendo como se tivesse ocorrido o maior ferimento... É uma circunstância surpreendente, apenas os indivíduos do sexo masculino estão sujeitos a essa estranha afecção, mas nem todos eles estão predispostos a ela... Embora as mulheres sejam isentas, elas ainda são capazes de transmiti-la a seus filhos do sexo masculino."

John Otto (1803)

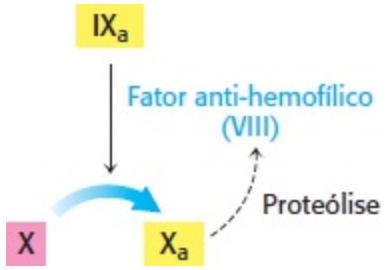


Figura 10.33 Ação do fator anti-hemofílico. O fator anti-hemofílico (fator VIII) estimula a ativação do fator X pelo fator IX_2. É interessante assinalar que a atividade do fator VIII é acentuadamente aumentada por proteólise limitada pela trombina. Essa retroalimentação positiva amplifica o sinal da coagulação e acelera a formação do coágulo após ter sido alcançado um limiar.

O processo da coagulação precisa ser regulado com precisão

Existe uma linha divisória tênue entre hemorragia e trombose, isto é, a formação de coágulos de sangue nos vasos sanguíneos. Os coágulos precisam ser formados rapidamente; contudo, devem permanecer confinados à área de lesão. Quais são os mecanismos que normalmente limitam a formação de coágulo ao local de lesão? A labilidade dos fatores da coagulação contribui significativamente para o controle da coagulação. Os fatores ativados são de vida curta, visto que são diluídos pelo fluxo sanguíneo, removidos pelo fígado e degradados por proteases. Por exemplo, os fatores proteicos estimuladores V_a e $VIII_a$ são digeridos pela proteína C, uma protease acionada pela ação da trombina. *Por conseguinte, a trombina desempenha uma dupla função: catalisa a formação de fibrina e inicia a desativação da cascata da coagulação.*

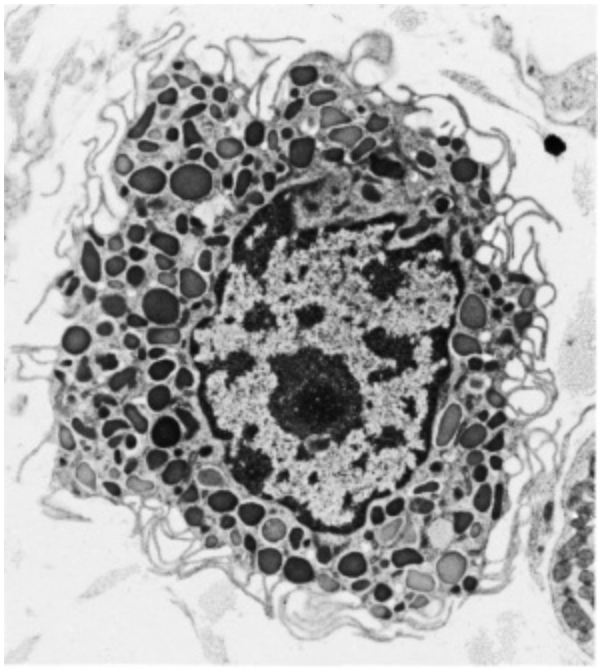


Figura 10.34 Micrografia eletrônica de um mastócito. A heparina e outras moléculas nos grânulos densos são liberadas no espaço extracelular quando a célula é estimulada a secretar. [Cortesia de Lynne Mercer.]

Os inibidores específicos dos fatores da coagulação também são críticos no término da coagulação. Por exemplo, o *inibidor da via do fator tecidual* (TFPI, do inglês *tissue factor pathway*

inhibitor) inibe o complexo TF-VII_a-X_a. Domínios separados no TFPI inibem os fatores VII_a e X_a. Outro inibidor essencial é a *antitrombina III,* uma proteína plasmática que inativa a trombina pela formação de um complexo irreversível com ela. A antitrombina III assemelha-se à antitripsina α_1, exceto pelo fato de inibir a trombina muito mais fortemente do que inibe a elastase (ver Figura 10.24). A antitrombina III também bloqueia outras serinas proteases na cascata da coagulação – isto é, os fatores XII_a, XI_a, IX_a e X_a. A ação inibitória da antitrombina III é potencializada pela *heparina*, um polissacarídio de carga negativa, encontrado em mastócitos situados perto das paredes dos vasos sanguíneos e nas superfícies das células endoteliais (Figura 10.34). A heparina atua como *anticoagulante,* visto que aumenta a velocidade de formação de complexos irreversíveis entre a antitrombina III e os fatores da coagulação serina proteases. A antitripsina e antitrombina são *serpinas,* uma família de *in*ibidores de *ser*ina *p*roteases (*ser*ine *p*rotease *in*hibitors).

A importância da razão entre a trombina e a antitrombina é ilustrada no caso de um menino de 14 anos de idade, falecido de um distúrbio hemorrágico devido a uma mutação na sua antitripsina α_1, que normalmente inibe a elastase. A metionina 358 na cavidade de ligação da antitripsina α_1 à elastase foi substituída por arginina, resultando em uma mudança na especificidade de um inibidor da elastase para um inibidor da trombina. A atividade da antitripsina α_1 normalmente aumenta de modo acentuado após a ocorrência de lesão, para neutralizar o excesso de elastase que surge em consequência dos neutrófilos estimulados. A antitripsina α_1 mutante causou uma queda da atividade de trombina do paciente para um nível tão baixo a ponto de resultar em hemorragia. Vemos aqui um exemplo notável de como uma mudança de um único resíduo em uma proteína pode alterar drasticamente a especificidade, bem como um exemplo da grande importância da quantidade correta de inibidor da protease.

A antitrombina limita o grau de formação de coágulos, porém o que ocorre com os próprios coágulos? Os coágulos não são estruturas permanentes, porém são formados para se dissolver quando a integridade estrutural da área lesionada for restaurada. A fibrina é clivada pela *plasmina,* uma serina protease que hidrolisa ligações peptídicas nas regiões espiraladas. As moléculas de plasmina podem se difundir através de canais aquosos no coágulo de fibrina poroso, cortando os bastões conectores acessíveis. A plasmina é formada pela ativação proteolítica do *plasminogênio,* um precursor inativo que exibe alta afinidade pelos coágulos de fibrina. Essa conversão é efetuada pelo *ativador do plasminogênio tecidual* (TPA), uma proteína de 72 kDa, que apresenta uma estrutura em domínios estreitamente relacionada com a da protrombina (Figura 10.35). Entretanto, um domínio que direciona o TPA para coágulos de fibrina substitui o domínio gla da protrombina de direcionamento para membranas. O TPA ligado aos coágulos de fibrina ativa prontamente o plasminogênio aderido. Por outro lado, o TPA ativa o plasminogênio livre muito lentamente. O gene para o TPA foi clonado e expresso em células de mamíferos em cultura. Os estudos clínicos realizados mostraram que a administração de TPA por via intravenosa dentro de uma hora após a formação de um coágulo sanguíneo em uma artéria coronária aumenta acentuadamente a probabilidade de sobrevida a um ataque cardíaco (Figura 10.36).

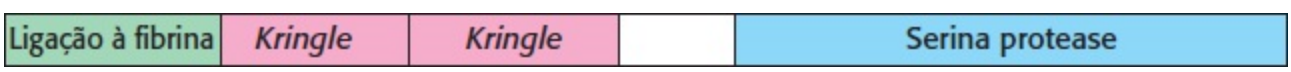


Figura 10.35 Estrutura modular do ativador do plasminogênio tecidual (TPA).

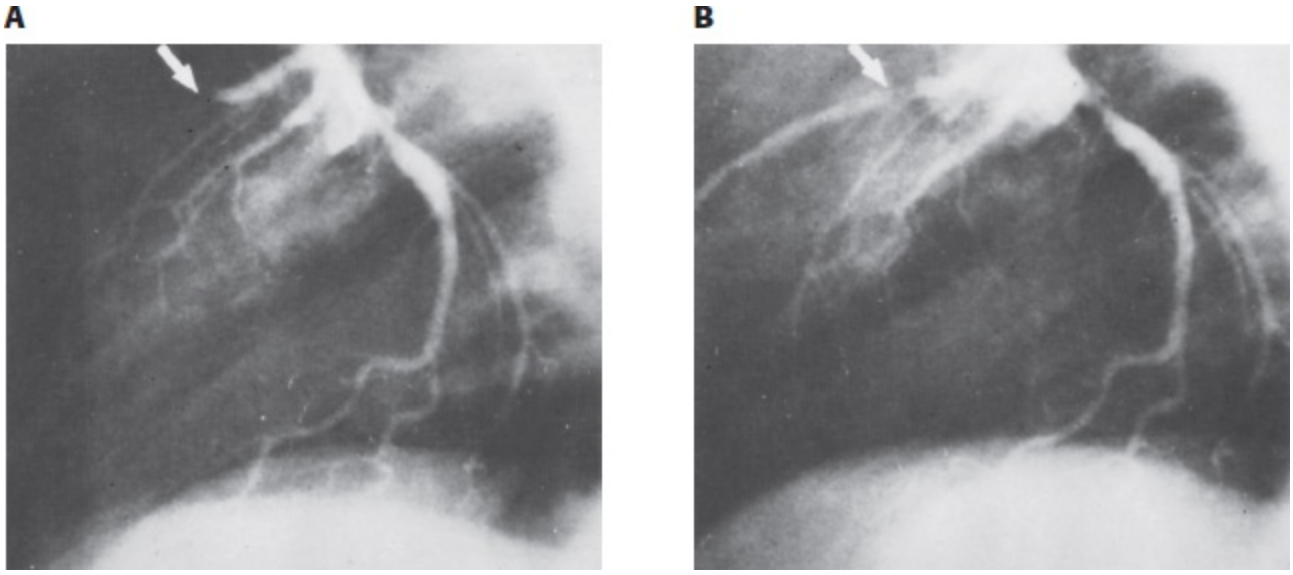


Figura 10.36 O efeito do ativador do plasminogênio tecidual. O TPA leva à dissolução dos coágulos sanguíneos, como mostram as radiografias de vasos sanguíneos do coração antes (**A**) e 3 h depois (**B**) da administração de TPA. A posição do coágulo está marcada pela seta na figura A. [Segundo F. Van de Werf, P. A. Ludbrook, S. R. Bergmann, A. J. Tiefenbrunn, K.A.A. Fox, H. de Geest, M. Verstraete, D. Collen e B. E. Sobel. *New Engl. J. Med.* 310(1984):609-613.]

Resumo

10.1 A aspartato transcarbamilase é inibida alostericamente pelo produto final da sua via

As proteínas alostéricas constituem uma classe importante de proteínas, cuja atividade biológica pode ser regulada. Moléculas reguladoras específicas podem modular a atividade das proteínas alostéricas mediante a sua ligação a sítios regulatórios distintos, separados dos sítios funcionais. Essas proteínas apresentam múltiplos sítios funcionais, que exibem cooperação, conforme evidenciado por uma dependência sigmoide da função em relação à concentração de substrato. A aspartato transcarbamilase (ATCase), uma das enzimas alostéricas mais bem conhecidas, catalisa a síntese de *N*-carbamilaspartato, o primeiro intermediário na síntese de pirimidinas. A ATCase é inibida por retroalimentação pela citidina trifosfato, o produto final da via. O ATP reverte essa inibição. A ATCase é constituída de subunidades catalíticas (c_3) (que se ligam aos substratos) e subunidades regulatórias (r_2) (que se ligam à CTP e ao ATP). O efeito inibidor da CTP, a ação estimuladora do ATP e a ligação cooperativa dos substratos são mediados por grandes alterações na estrutura quaternária. Com a ligação aos substratos, as subunidades c_3 da enzima c_6r_6 afastam-se e reorientam-se. Essa transição alostérica é altamente coordenada. Todas as subunidades de uma molécula de ATCase se interconvertem simultaneamente do estado T (de baixa afinidade) para o estado R (de alta afinidade).

10.2 As isozimas fornecem um meio de regulação específica para diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento

As isoenzimas diferem nas suas características estruturais, porém catalisam a mesma reação. Fornecem um meio de ajuste fino do metabolismo para atender às necessidades de determinado tecido ou estágio de desenvolvimento. Os resultados de eventos de duplicação gênica fornecem o mecanismo para uma regulação sutil da função enzimática.

10.3 A modificação covalente constitui um meio de regular a atividade enzimática

A modificação covalente das proteínas constitui um meio potente de controlar a atividade das enzimas e de outras proteínas. A fosforilação representa o tipo mais comum de modificação covalente reversível. Os sinais podem ser altamente amplificados pela fosforilação, visto que uma única quinase pode atuar em muitas moléculas-alvo. As ações reguladoras das proteína quinases são revertidas por proteína fosfatases, que catalisam a hidrólise de grupos fosforila ligados.

O AMP cíclico atua como mensageiro intracelular na transdução de numerosos estímulos hormonais e sensoriais. O AMP cíclico ativa a proteína quinase A, uma importante quinase multifuncional, pela sua ligação à subunidade regulatória da enzima, liberando, assim, as subunidades catalíticas ativas da PKA. Na ausência de cAMP, os sítios catalíticos da PKA são ocupados por sequências de pseudossubstrato da subunidade regulatória.

10.4 Muitas enzimas são ativadas por clivagem proteolítica específica

A ativação de uma enzima pela clivagem proteolítica de uma ou de algumas ligações peptídicas constitui um mecanismo de controle recorrente observado em processos tão diversos quanto a ativação das enzimas digestivas e da coagulação sanguínea. O precursor inativo é um zimogênio (proenzima). O tripsinogênio é ativado pela enteropeptidase ou tripsina, e, em seguida, a tripsina ativa inúmeros outros zimogênios, levando à digestão dos alimentos. Por exemplo, a tripsina converte o quimiotripsinogênio, um zimogênio, em quimiotripsina ativa pela hidrólise de uma única ligação peptídica.

Uma característica notável do processo de coagulação é que ele ocorre por uma cascata de conversões de zimogênios, em que a forma ativada de um fator da coagulação catalisa a ativação do próximo precursor. Muitos dos fatores da coagulação ativados são serina proteases. Na etapa final de formação do coágulo, o fibrinogênio, uma molécula altamente solúvel do plasma, é convertido pela trombina em fibrina, por meio da hidrólise de quatro ligações de arginina-glicina. O monômero de fibrina resultante forma espontaneamente fibras longas e insolúveis, denominadas fibrina. A ativação dos zimogênios também é essencial na lise dos coágulos. O plasminogênio é convertido em plasmina, uma serina protease que cliva a fibrina, pelo ativador do plasminogênio tecidual. Embora a ativação dos zimogênios seja irreversível, inibidores específicos de algumas proteases exercem um controle. A antitrombina III, o inibidor proteico irreversível, mantém a coagulação sob controle na cascata da coagulação.

Palavras-chave

cascata enzimática (p. 309)
cooperatividade (p. 291)
efeito heterotrópico (p. 298)
efeito homotrópico (p. 296)
inibição por retroalimentação (pelo produto final) (p. 293)
isoenzima (isozima) (p. 298)
mecanismo concertado (p. 296)
modelo sequencial (p. 296)

modificação covalente (p. 299)
proteína fosfatase (p. 302)
proteína quinase (p. 300)
proteína quinase A (PKA) (p. 303)
sequência de consenso (p. 301)
sequência de pseudossubstrato (p. 303)
sítio alostérico (regulador) (p. 293)
via extrínseca (p. 310)
via intrínseca (p. 310)
zimogênio (proenzima) (p. 305)

Questões

1. *Considere o contexto.* As propriedades alostéricas da aspartato transcarbamilase foram discutidas detalhadamente neste capítulo. Qual é a função da aspartato transcarbamilase?

2. *Perfil de atividade*. Acredita-se que a presença de um resíduo de histidina no sítio ativo da aspartato transcarbamilase seja importante na estabilização do estado de transição dos substratos ligados. Preveja a dependência da velocidade de catálise em relação ao pH, pressupondo que essa interação seja essencial e que domine o perfil de atividade da enzima em função do pH. (Ver equações na p. 18.)

3. *Sabendo determinar o tempo.* O que é inibição por retroalimentação? Por que se trata de uma propriedade útil?

4. *Sabendo quando seguir em frente.* Qual é a justificativa bioquímica para a ação do ATP como regulador positivo da ATCase?

5. *Sem T.* Qual seria o efeito de uma mutação em uma enzima alostérica que resultasse em uma razão T/R de 0?

6. *Virar do avesso.* Uma enzima alostérica que segue o mecanismo concertado tem uma razão T/R de 300 na ausência de substrato. Suponha que uma mutação tenha invertido essa razão. Como essa mutação poderia afetar a relação entre a velocidade da reação e a concentração de substrato?

7. *Parceiros.* Conforme ilustrado na Figura 10.2, a CTP inibe a ATCase; todavia, essa inibição não é completa. Você pode sugerir outra molécula passível de potencializar a inibição da ATCase? Dica: Ver a Figura 25.2.

8. *Equilíbrio RT.* Diferencie os efetores homotrópicos dos heterotrópicos.

9. *Projeto de restauração.* Quando subunidades regulatórias e subunidades catalíticas isoladas da ATCase são misturadas, a enzima nativa é reconstituída. Qual é o significado biológico dessa observação?

10. *Porque é uma enzima.* Os estudos de cristalografia de raios X da ATCase na forma R exigiram o uso do análogo de bissubstratos, PALA. Por que esse análogo, um inibidor competitivo, foi usado em lugar dos verdadeiros substratos?

11. *Acionamento alostérico.* Um substrato liga-se 100 vezes mais firmemente ao estado R de uma

enzima alostérica do que a seu estado T. Suponha que o modelo concertado (MWC) se aplique a essa enzima. (Ver as equações para o Modelo concertado no Apêndice do Capítulo 7.)

(a) Por qual fator a ligação de uma molécula de substrato por molécula de enzima altera a razão entre as concentrações das moléculas de enzima nos estados R e T?

(b) Suponha que L, a razão entre [T] e [R] na ausência de substrato, seja de 10^7, e que a enzima contenha quatro sítios de ligação para o substrato. Qual é a razão entre as moléculas de enzima no estado R e no estado T na presença de quantidades saturantes de substrato, supondo que seja seguido o modelo concertado?

12. *Transição alostérica.* Considere uma proteína alostérica que obedeça ao modelo concertado. Suponha que a razão entre T e R formada na ausência de ligantes seja de 10^5, K_T = 2 mM e K_M = 5 μM. A proteína contém quatro sítios de ligação para ligantes. Qual é a fração de moléculas na forma R quando 0, 1, 2, 3 e 4 ligantes estão ligados? (Ver as equações para o Modelo concertado no Apêndice do Capítulo 7.)

13. *Cooperatividade negativa.* Você isolou uma enzima dimérica que contém dois sítios ativos idênticos. A ligação do substrato a um sítio ativo diminui a afinidade do substrato pelo outro sítio ativo. O modelo concertado pode explicar essa cooperatividade negativa?

14. *Paradoxal à primeira vista.* Lembre-se de que o fosfonoacetil-L-aspartato (PALA) é um poderoso inibidor da ATCase, visto que ele imita os dois substratos fisiológicos. Entretanto, esse análogo bissubstrato não reativo em baixas concentrações *aumenta* a velocidade da reação. Com a adição de PALA, a velocidade da reação aumenta até a ligação de três moléculas de PALA, em média, por molécula de enzima. Essa velocidade máxima é 17 vezes maior do que na ausência de PALA. Em seguida, a velocidade da reação diminui para quase zero com a adição de mais três moléculas de PALA por molécula de enzima. Por que o PALA em baixas concentrações ativa a ATCase?

15. *Energética de regulação.* A fosforilação e a desfosforilação de proteínas constituem um meio vital de regulação. As proteína quinases ligam grupos fosforila, enquanto apenas uma fosfatase remove o grupo fosforila da proteína-alvo. Qual é o custo energético dessa forma de regulação covalente?

16. *Viva a diferença.* O que é uma isozima, ou isoenzima?

17. *Controle fino da bioquímica.* Qual é a vantagem da presença de formas isoenzimáticas de uma enzima para um organismo?

18. *Faça as correspondências.*

(a) ATCase____	1. Fosforilação proteica
(b) Estado T ____	2. Necessário(a) para modificar o glutamato
(c) Estado R _____	
(d) Fosforilação ____	3. Ativa uma determinada quinase

(e) Quinase _____

(f) Fosfatase _____

(g) cAMP _____

(h) Zimogênio _____

(i) Enteropeptidase _____

(j) Vitamina K _____

(l) Fator tecidual _____

4. Proenzima

5. Ativa a tripsina

6. Modificação covalente comum

7. Inibido(a) pela CTP

8. Estado menos ativo de uma proteína alostérica

9. Inicia a via extrínseca

10. Forma a fibrina

11. Estado mais ativo de uma proteína alostérica

12. Remove fosfatos

19. *Modificação energética.* A fosforilação constitui uma modificação covalente comum das proteínas em todas as formas de vida. Quais são as vantagens energéticas obtidas com o uso do ATP como doador de fosforila?

20. *Sem retorno.* Qual é a diferença fundamental entre regulação por modificação covalente e clivagem proteolítica específica?

21. *Ativação de zimogênio*. Quando concentrações muito baixas de pepsinogênio são acrescentadas a meios ácidos, como a meia-vida de ativação depende da concentração do zimogênio?

22. *Nenhuma proteína perturba de modo intencional.* Preveja os efeitos fisiológicos de uma mutação que resultou em uma deficiência de enteropeptidase.

23. *Um teste revelador.* Suponha que você tenha acabado de examinar um menino com distúrbio hemorrágico altamente sugestivo de hemofilia clássica (deficiência de fator VIII). Devido ao horário tardio, o laboratório que realiza testes de coagulação especializados está fechado. Entretanto, você por acaso tem uma amostra de sangue de um hemofílico clássico que foi internado em horário mais cedo. Qual é o teste mais simples e mais rápido que você pode efetuar para determinar se o seu paciente atual também apresenta deficiência de atividade do fator VIII?

24. *Contraponto.* A síntese do fator X, como a da protrombina, necessita de vitamina K. O fator X também contém resíduos de γ-carboxiglutamato em sua região aminoterminal. Entretanto, o fator X ativado, diferentemente da trombina, conserva essa região da molécula. Qual é a provável consequência funcional dessa diferença entre as duas espécies ativadas?

25. *Um inibidor discriminante.* A antitrombina III forma um complexo irreversível com a trombina, mas não com a protrombina. Qual é a razão mais provável para essa diferença de reatividade?

26. *Heptapeptídios repetitivos.* Cada um dos três tipos de cadeias de fibrina contém unidades

heptapeptídicas (*abcdefg*) repetidas, nas quais os resíduos *a* e *d* são hidrofóbicos. Proponha uma razão para essa regularidade.

27. *Planejamento de fármacos.* Uma companhia farmacêutica decidiu utilizar métodos de DNA recombinante para preparar uma antitripsina α_1 modificada, que deverá ser mais resistente à oxidação do que o inibidor de ocorrência natural. Qual substituição de um único aminoácido você recomendaria?

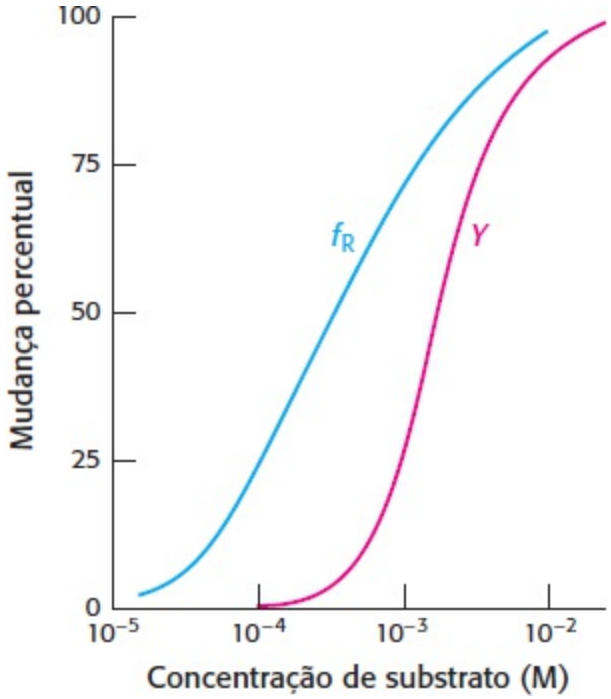
28. *O sangue deve fluir.* Por que a formação inadequada de coágulos sanguíneos é perigosa?

29. *Fileira de dissolução.* Qual é o ativador do plasminogênio tecidual e qual o seu papel na prevenção de ataques cardíacos?

30. *Juntando.* O que diferencia um coágulo mole de um coágulo maduro?

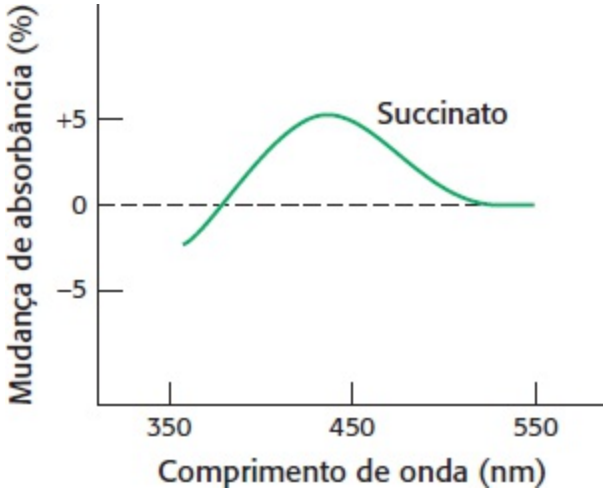
Questões | Interpretação de dados

31. *Distinguindo os modelos.* O gráfico seguinte mostra a fração de uma enzima alostérica no estado R (f_R) e a fração de sítios ativos ligados ao substrato (Y) em função da concentração de substrato. Que modelo – o concertado ou o sequencial – explica melhor esses resultados?



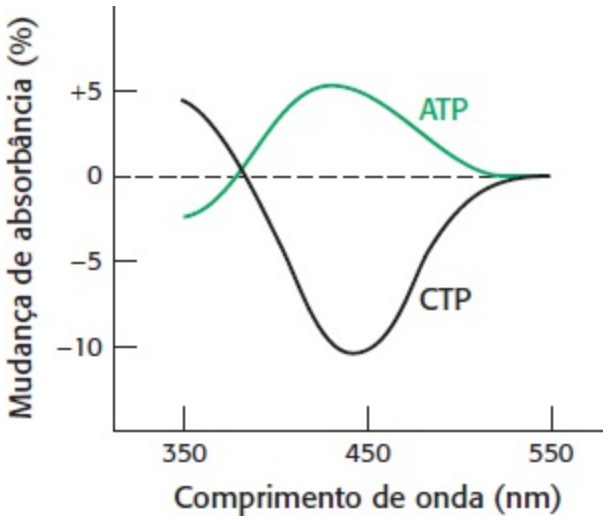
[Segundo M. W. Kirschner and H. K. Schachman. Biochemistry 12:2997-3004, 1066.]

32. *Comunicação ao vivo a partir da ATCase 1.* A ATCase sofreu reação com o tetranitrometano, formando um grupo nitrotirosina ($\lambda_{máx.} = 430$ nm) colorido em cada uma de suas cadeias catalíticas. A absorção por esse grupo repórter depende de seu ambiente imediato. Um resíduo de lisina essencial em cada sítio catalítico também foi modificado para bloquear a ligação do substrato. Trímeros catalíticos dessa enzima duplamente modificada foram então combinados com trímeros nativos para formar uma enzima híbrida. A absorção pelo grupo nitrotirosina foi medida após a adição de succinato um análogo do substrato. Qual é o significado da alteração na absorbância a 430 nm?



[Segundo H. K. Schachman. J. Biol. Chem. 263:18583-18586, 1988.]

33. *Comunicação ao vivo a partir da ATCase 2.* Foi construído um híbrido de ATCase diferente para testar os efeitos de ativadores alostéricos e inibidores. Subunidades regulatórias normais foram combinadas com subunidades catalíticas contendo nitrotirosina. A adição de ATP na ausência de substrato aumentou a absorbância a 430 nm, a mesma alteração produzida pela adição de succinato (ver o gráfico na Questão 32). Por outro lado, a CTP na ausência de substrato diminuiu a absorbância em 430 nm. Qual é o significado das alterações na absorção dos grupos repórteres?



[Segundo H. K. Schachman. *J. Biol. Chem.* 263:18583-18586, 1988.]

Questões | Integração de capítulos

34. *A densidade faz diferença.* O valor de sedimentação da aspartato transcarbamilase diminui quando a enzima passa para o estado R. Com base nas propriedades alostéricas da enzima, explique por que o valor de sedimentação diminui.

35. *Aperto de mão muito forte.* A tripsina cliva proteínas no lado carboxílico da lisina. O inibidor da tripsina tem um resíduo de lisina e liga-se à tripsina; contudo, não se trata de um substrato. Explique.

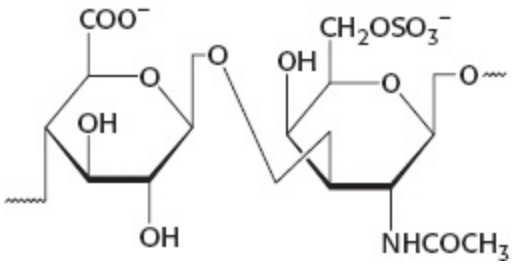
Questões sobre mecanismo

36. *Aspartato transcarbamilase.* Escreva o mecanismo (em detalhes) da conversão do aspartato e carbamilfosfato em *N*-carbamilaspartato. Inclua um papel para o resíduo de histidina presente no sítio ativo.

37. *Proteína quinases.* Escreva o mecanismo (em detalhes) para a fosforilação de um resíduo de serina pelo ATP, em uma reação catalisada por uma proteína quinase. Que grupos você pode esperar encontrar no sítio ativo da enzima?

Carboidratos

11



Os carboidratos são importantes fontes de energia, porém desempenham muitas outras funções bioquímicas, como a proteção contra forças de alto impacto. A cartilagem do pé de um corredor, por exemplo, amortece o impacto de cada passo. Um componente essencial da cartilagem são as moléculas denominadas glicosaminoglicanos, grandes polímeros constituídos por numerosas repetições de dímeros, como o par mostrado acima. [Radiografia sem título/Nick Veasey/Getty Images.]

SUMÁRIO

11.1 Os monossacarídios são os carboidratos mais simples

11.2 Os monossacarídios estão ligados entre si para formar carboidratos complexos

11.3 Os carboidratos podem ligar-se às proteínas para formar glicoproteínas

11.4 As lectinas são proteínas que ligam carboidratos específicos

Durante muitos anos, o estudo dos carboidratos foi considerado menos interessante do que muitos outros temas da bioquímica. Os carboidratos eram reconhecidos como importantes fontes de energia e componentes estruturais, porém acreditava-se que estivessem subordinados à maioria das atividades essenciais da célula. Em essência, eram considerados a viga mestra e fonte de energia subjacente de uma suntuosa obra de arquitetura bioquímica. Essa visão mudou muito nos últimos anos. Aprendemos que as células de todos os organismos são revestidas por uma densa e complexa camada de carboidratos. As proteínas secretadas são, com frequência, extensamente decoradas com carboidratos essenciais a determinada função de uma proteína. A matriz extracelular nos eucariotos superiores – o ambiente no qual vivem as células – é rico em carboidratos secretados, que são fundamentais para a sobrevida da célula e a intercomunicação celular. Os carboidratos são cruciais para o desenvolvimento e o funcionamento de todos os organismos, não apenas como fonte de energia, mas também como moléculas ricas em informações. Os carboidratos, as proteínas que contêm carboidratos e as proteínas específicas que ligam carboidratos são necessários para interações que tornam as células capazes de formar tecidos, constituem a base dos grupos sanguíneos nos seres humanos e são usados por uma variedade de patógenos para ter acesso a seus hospedeiros. Com efeito, mais do que meros componentes infraestruturais, os carboidratos contribuem com detalhes e realces para a arquitetura bioquímica da célula, ajudando a definir a beleza, a funcionalidade e a singularidade das células.

Uma propriedade importante dos carboidratos que possibilita o desempenho de suas numerosas funções é a enorme *diversidade* estrutural possível dentro dessa classe de moléculas. Os carboidratos são formados a partir de monossacarídios, pequenas moléculas – contendo, tipicamente, três a nove átomos de carbono ligados a grupos hidroxila – que variam no tamanho e na configuração estereoquímica em um ou mais centros de carbono. Esses monossacarídios podem ligar-se uns aos outros, formando uma grande variedade de estruturas oligossacarídicas. A quantidade de oligossacarídios possíveis torna essa classe de moléculas rica em informações, as quais podem aumentar ainda mais a imensa diversidade das proteínas quando se ligam a elas.

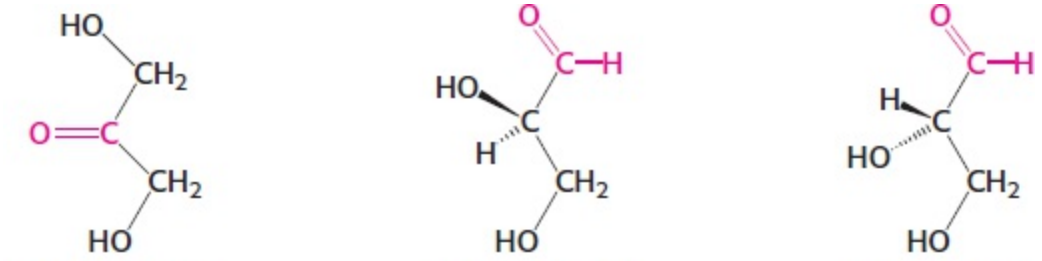
O reconhecimento da importância dos carboidratos para numerosos aspectos da bioquímica deu origem a um campo de estudo conhecido como *glicobiologia*. A glicobiologia é o estudo da síntese e da estrutura dos carboidratos e do modo pelo qual se ligam a outras moléculas, como as proteínas, e são reconhecidos por elas. Ao lado desse novo campo, surge uma nova "ômica" para juntar-se à genômica e à proteômica – a *glicômica*. A glicômica é o estudo do glicoma, isto é, de todos os carboidratos e moléculas associadas a carboidratos produzidos pelas células. À semelhança do proteoma, o glicoma não é estático e pode se modificar, dependendo das condições celulares e ambientais. A elucidação das estruturas dos oligossacarídios e dos efeitos de sua ligação a outras moléculas constitui um grande desafio no campo da bioquímica.

11.1 Os monossacarídios são os carboidratos mais simples

Os carboidratos são moléculas à base de carbono ricas em grupos hidroxila. Com efeito, a fórmula empírica de muitos carboidratos é $(CH_2O)_n$ – literalmente, um hidrato de carbono. Os carboidratos simples são denominados monossacarídios. Esses açúcares simples servem não apenas como fontes de energia, mas também como componentes fundamentais dos sistemas vivos. Por exemplo, o DNA é construído a partir de açúcares simples: seu arcabouço é constituído de grupos fosforila alternados e

desoxirribose, um açúcar cíclico de cinco carbonos.

Os monossacarídios são aldeídos ou cetonas que têm dois ou mais grupos hidroxila. Os monossacarídios menores, compostos de três átomos de carbono, são a di-hidroxiacetona e o D e L-gliceraldeído.



Di-hidroxiacetona (uma cetose)

D-gliceraldeído (uma aldose)

L-gliceraldeído (uma aldose)

A di-hidroxiacetona é chamada de *cetose*, pois contém um grupo ceto (em vermelho, acima), enquanto o gliceraldeído é uma *aldose*, já que contém um grupo aldeído. Ambos são designados como *trioses* (tri para indicar três, referindo-se aos três átomos de carbono que eles contêm). De modo semelhante, os monossacarídios simples com quatro, cinco, seis e sete átomos de carbono são denominados, respectivamente, *tretoses*, *pentoses*, *hexoses* e *heptoses*. Talvez os monossacarídios que mais conhecemos são as hexoses, como a glicose e a frutose. A glicose representa uma fonte de energia essencial para praticamente todas as formas de vida. A frutose é comumente utilizada como adoçante, sendo convertida em derivados de glicose no interior da célula.

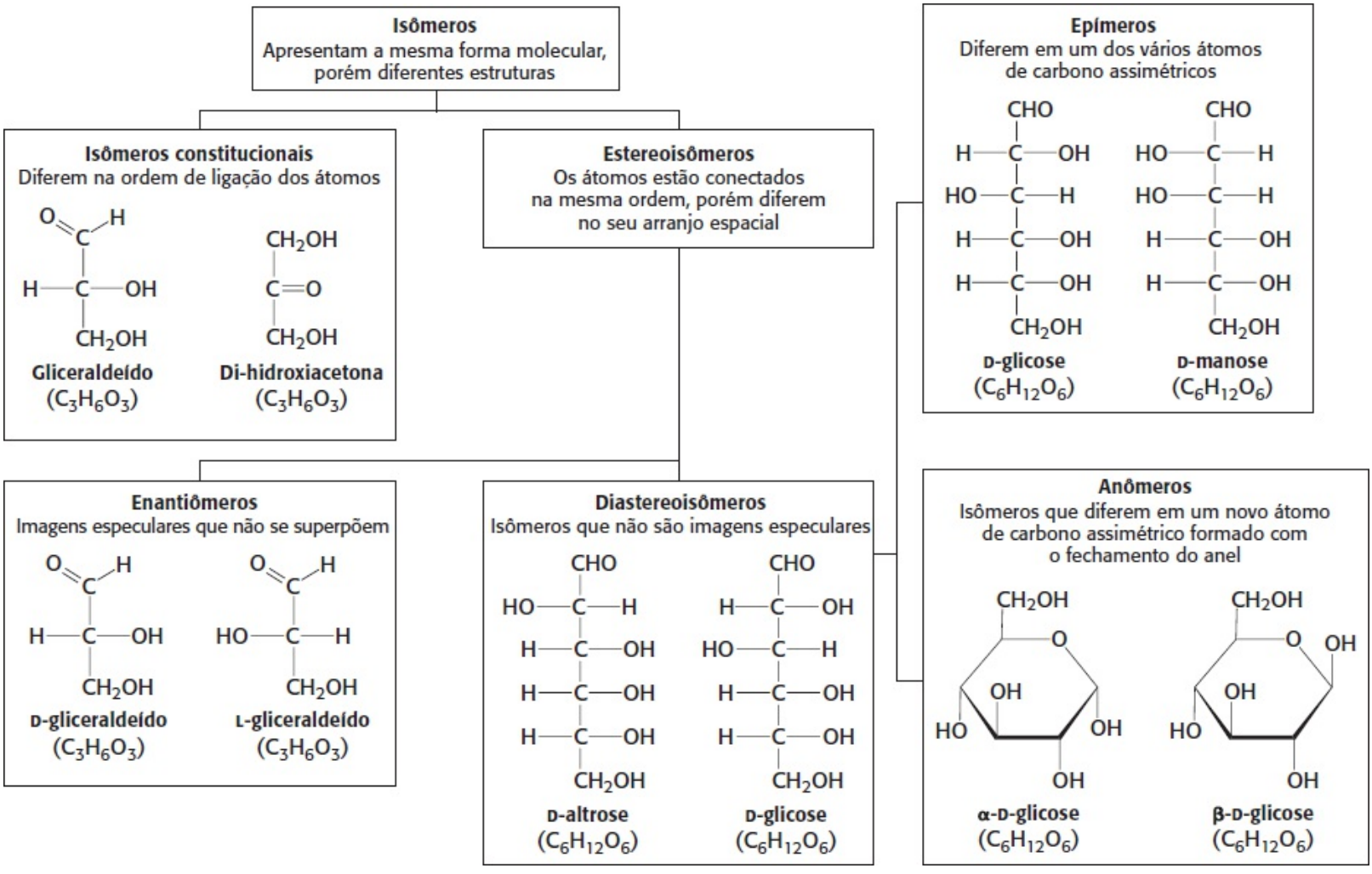


Figura 11.1 Formas isoméricas dos carboidratos.

Os carboidratos podem existir em uma variedade deslumbrante de formas isoméricas (Figura 11.1). A di-hidroxiacetona e o gliceraldeído são denominados *isômeros constitucionais*, uma vez que apresentam fórmulas moleculares idênticas, porém diferem na ordenação dos átomos. Os estereoisômeros são isômeros que diferem no seu arranjo espacial. Conforme discutido anteriormente sobre os aminoácidos (p. 29), os estereoisômeros são designados pela sua configuração D ou L. O gliceraldeído tem um único átomo de carbono assimétrico, e, portanto, existem dois estereoisômeros desse açúcar: o D-gliceraldeído e o L-gliceraldeído. Essas moléculas constituem um tipo de estereoisômero, denominadas *enantiômeros*, que são imagens especulares uma da outra. Os monossacarídios de vertebrados têm, em sua maioria, a configuração D. Por convenção, os isômeros D e L são determinados pela configuração do átomo de carbono assimétrico mais distante do grupo aldeído ou ceto. A di-hidroxiacetona é o único monossacarídio que não tem sequer um átomo de carbono assimétrico.

Os monossacarídios constituídos de mais de três átomos de carbono têm múltiplos carbonos assimétricos e, portanto, podem existir não apenas como enantiômeros, mas também como *diastereoisômeros*, isto é, isômeros que não são imagens especulares um do outro. O número de estereoisômeros possíveis é igual a 2_n, onde n é o número de átomos de carbono assimétricos. Por conseguinte, uma aldose de seis carbonos com quatro átomos de carbono assimétricos pode existir em 16 diastereoisômeros possíveis, sendo a glicose um desses isômeros.

A Figura 11.2 mostra os açúcares comuns que veremos com mais frequência em nosso estudo de bioquímica. A D-ribose, o componente de carboidrato do RNA, é uma aldose de cinco carbonos, assim como a desoxirribose, o componente monossacarídico dos desoxinucleotídios. A D-glicose, a D-manose e a D-galactose são aldoses de seis carbonos abundantes. Observe que a D-glicose e a D-manose diferem somente na configuração em C-2, o átomo de carbono na segunda posição. Os açúcares diastereoisômeros que diferem na configuração em apenas um único centro de assimetria são denominados *epímeros*. Por conseguinte, a D-glicose e a D-manose são epímeras em C-2; a D-glicose e a D-galactose são epímeras em C-4.

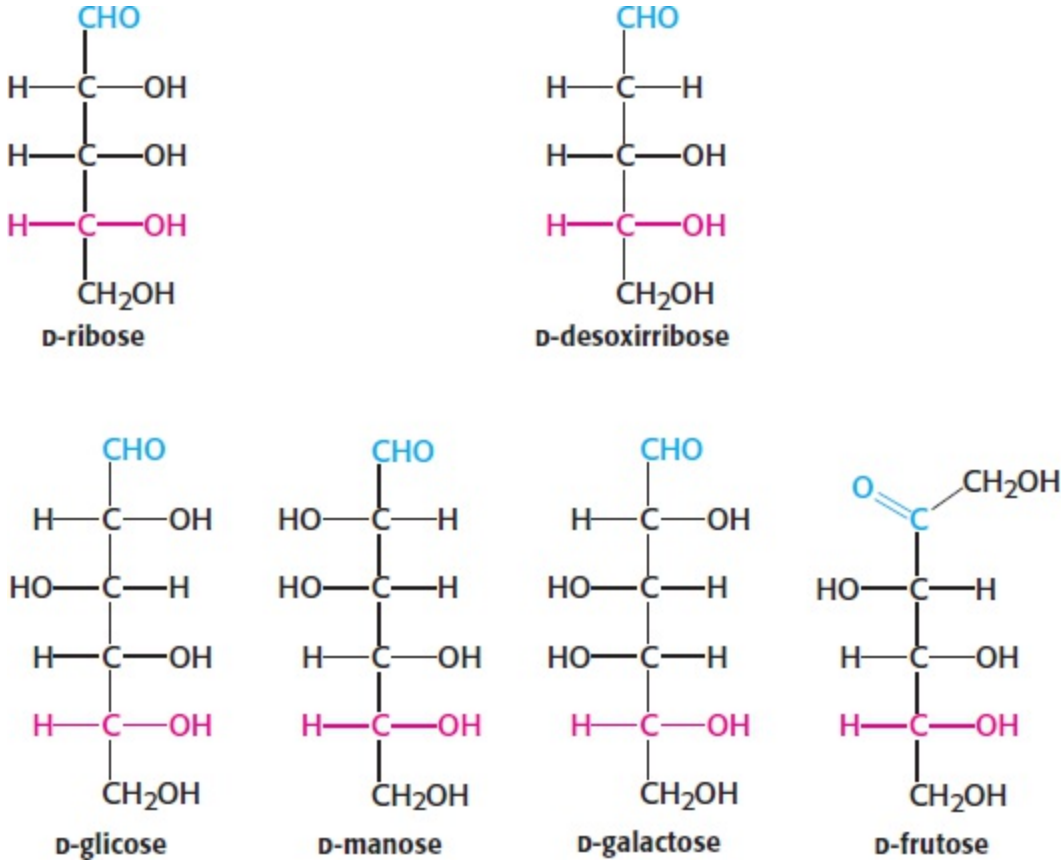
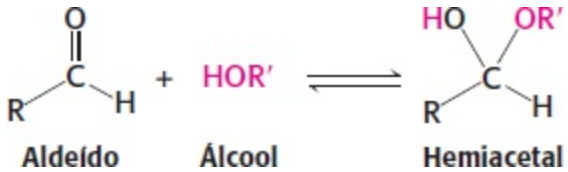


Figura 11.2 Monossacarídios comuns. As aldoses contém um aldeído (mostrado em azul), enquanto as cetoses, como a frutose, contêm uma cetose (também mostrada em azul). O átomo de carbono assimétrico mais distante do aldeído ou da cetona (mostrado em vermelho) designa as estruturas na configuração D.

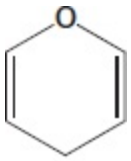
Observe que as cetoses apresentam um centro assimétrico a menos do que as aldoses com o mesmo número de átomos de carbono. A D-frutose é a mais abundante das ceto-hexoses.

Muitos açúcares comuns existem em formas cíclicas

As formas predominantes da ribose, da glicose, da frutose e de muitos outros açúcares em solução, como ocorre no interior da célula, não estão em cadeias abertas. Na verdade, as formas abertas desses açúcares ciclizam-se em anéis. A base química para a formação do anel reside no fato de que um aldeído pode reagir com um álcool para formar um *hemiacetal*.

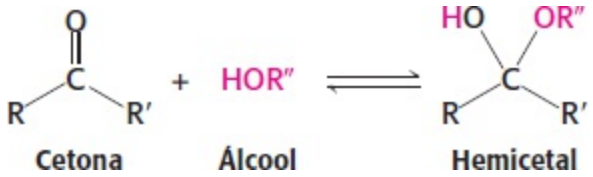


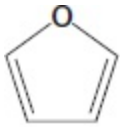
Para uma aldo-hexose, como a glicose, uma única molécula fornece tanto o aldeído quanto o álcool: o aldeído em C-1 na forma da glicose de cadeia aberta reage com o grupo hidroxila em C-5, formando um *hemiacetal intramolecular* (Figura 11.3). O hemiacetal cíclico resultante, um anel de seis membros, é denominado *piranose*, em virtude de sua semelhança com o *pirano*.



Pirano

De modo semelhante, uma cetona pode reagir com um álcool, formando um *hemicetal*.





Furano

O grupo ceto em C-2 na forma de cadeia aberta de uma ceto-hexose, como a frutose, pode formar um *hemicetal intramolecular* ao reagir com o grupo hidroxila em C-6, formando um hemicetal cíclico de seis membros, ou com o grupo hidroxila em C-5, formando um hemicetal cíclico de cinco membros (Figura 11.4). O anel pentagonal é denominado *furanose*, em virtude de sua semelhança com o *furano*.

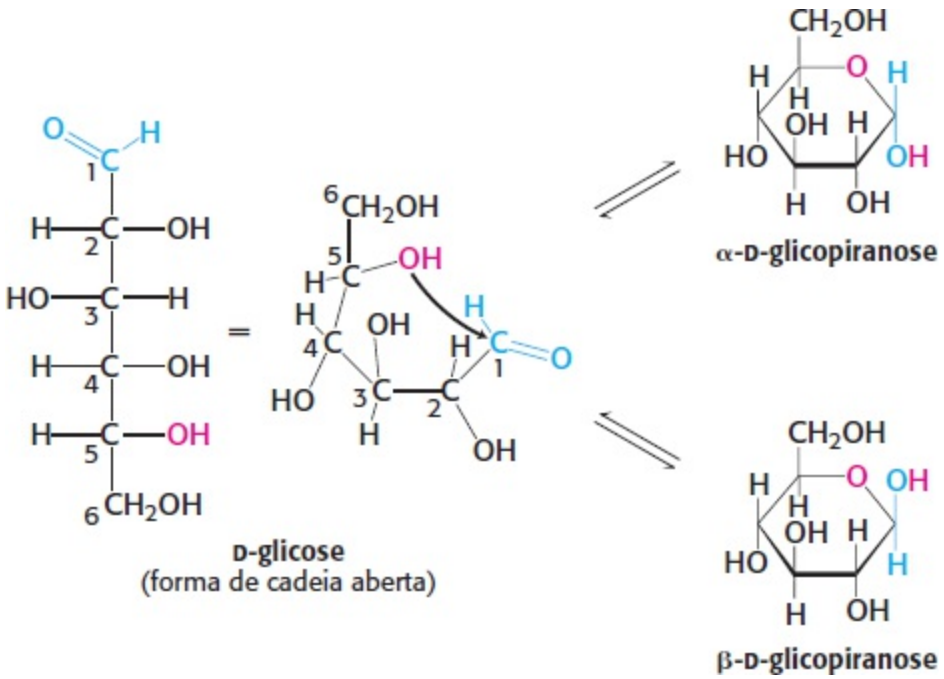


Figura 11.3 Formação de piranose. A forma da glicose de cadeia aberta cicliza-se quando o grupo hidroxila do C-5 ataca o átomo de oxigênio do grupo aldeído do C-1, formando um hemiacetal intramolecular. Podem resultar duas formas anoméricas, designadas como α e β.

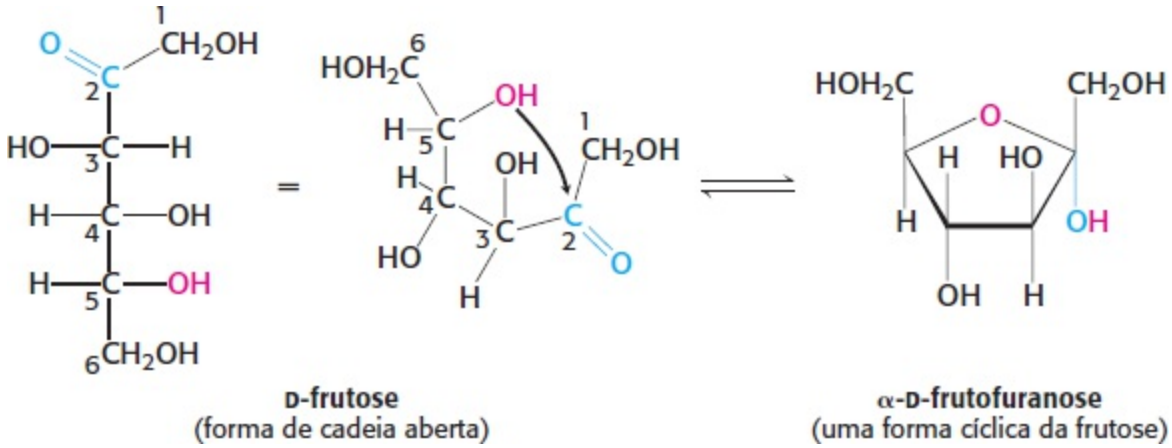


Figura 11.4 Formação de furanose. A forma da frutose de cadeia aberta cicliza-se para formar um anel pentagonal quando o grupo hidroxila do C-5 ataca a cetona do C-2, formando um hemicetal intramolecular. Dois anômeros são possíveis, porém apenas o anômero α é mostrado.

As representações da glicopiranose (glicose) e da frutofuranose (frutose) mostradas nas Figuras 11.3 e 11.4 são *projeções de Haworth*. Nessas projeções, os átomos de carbono do anel não são exibidos. O plano aproximado do anel é perpendicular ao plano do papel, e a linha espessa do anel projeta-se em direção ao leitor.

Verificamos que os carboidratos podem conter muitos átomos de carbono assimétricos. Um centro assimétrico adicional é criado quando se origina um hemiacetal cíclico, produzindo outra forma diastereoisomérica dos açúcares, denominada anômero. Na glicose, C-1 (o átomo de carbono carbonila na forma de cadeia aberta) torna-se um centro assimétrico. Por conseguinte, podem ser formadas duas estruturas em anel: a α-D-glicopiranose e a β-D-glicopiranose (ver Figura 11.3). Para os açúcares D representados nas projeções de Haworth na orientação padrão, conforme ilustrado na Figura 11.3, *a designação* α *significa que o grupo hidroxila ligado a C-1 está no lado oposto ao anel em relação a C-6;* β *significa que o grupo hidroxila está no mesmo lado do anel em relação a C-6.* O átomo de carbono C-1 é denominado *átomo de carbono anomérico)*, e as formas α e β são denominadas *anômeros.* Uma mistura em equilíbrio de glicose contém aproximadamente um terço do anômero α, dois terços do anômero β e < 1% da forma de cadeia aberta.

A forma da frutose em anel de furanose também tem formas anoméricas, em que α e β se referem aos grupos hidroxila ligados a C-2, o átomo de carbono anomérico (ver Figura 11.4). A frutose forma ambos os anéis de piranose e furanose. A forma de piranose predomina na frutose livre em solução, enquanto a forma de furanose predomina em muitos derivados da frutose (Figura 11.5).

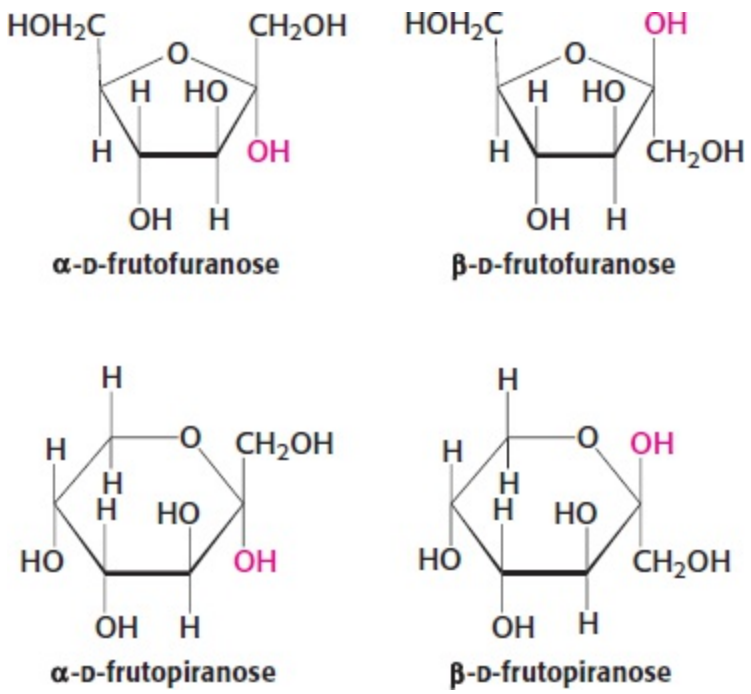


Figura 11.5 Estruturas em anel da frutose. A frutose pode formar tanto a furanose pentagonal quanto a piranose hexagonal. Em ambos os casos, são possíveis os anômeros tanto α quanto β.

A β-D-frutopiranose, que é encontrada no mel, é uma das substâncias mais doces conhecidas. A β-D-frutofuranose não é tão doce. O aquecimento converte a β-frutopiranose na forma β-frutofuranose, reduzindo o sabor doce da solução. Por esse motivo, o xarope de milho com alta concentração de frutose na forma de β-D-piranose é usado como adoçante em bebidas frias, mas não quentes. A Figura 11.6 mostra os açúcares comuns discutidos anteriormente em suas formas de anel.

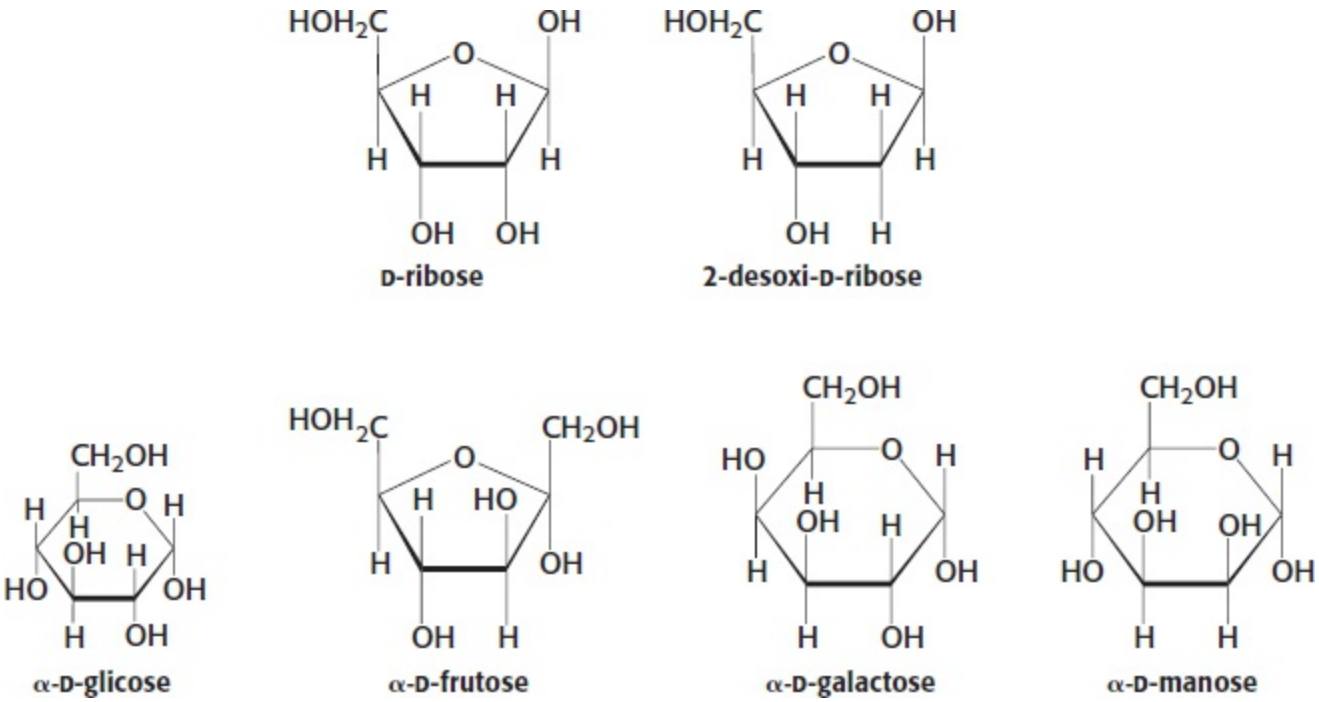


Figura 11.6 Monossacarídios comuns em suas formas de anel.

Os anéis de piranose e de furanose podem assumir diferentes conformações

O anel hexagonal de piranose não é plano, devido à geometria tetraédrica de seus átomos de carbonos saturados. Com efeito, os anéis de piranose adotam duas classes de conformação: em cadeira e em barco, pois se semelham a esses objetos (Figura 11.7). Na forma em cadeira, os substituintes nos átomos de carbono em anel apresentam duas orientações: axial e equatorial. As ligações *axiais* são quase perpendiculares ao plano médio do anel, enquanto as ligações *equatoriais* são quase paralelas a este plano. Os substituintes axiais impedem estericamente uns aos outros de emergirem do mesmo lado do anel (p.ex., grupos 1,3-diaxiais). Em contraste, os substituintes equatoriais são menos numerosos. A forma em cadeira da β-*D-glicopiranose predomina, visto que todas as posições axiais estão ocupadas por átomos de hidrogênio.* Os grupos — OH e — CH_2OH mais volumosos emergem na periferia menos impedida. A forma da glicose em barco é desfavorecida, devido ao acentuado impedimento estérico.

Os anéis de furanose, como os de piranose, não são planos. Podem ser pregueados, de modo que quatro átomos são quase coplanares, enquanto o quinto está distante desse plano em cerca de 0,5 Å (Figura 11.8). Essa conformação é denominada *forma em envelope*, visto que a estrutura assemelha-se a um envelope aberto, com a borda traseira levantada. Na ribose encontrada na maioria das biomoléculas, C-2 ou C-3 estão fora do plano do mesmo lado que C-5. Essas conformações são denominadas C-2-endo e C-3-endo, respectivamente.

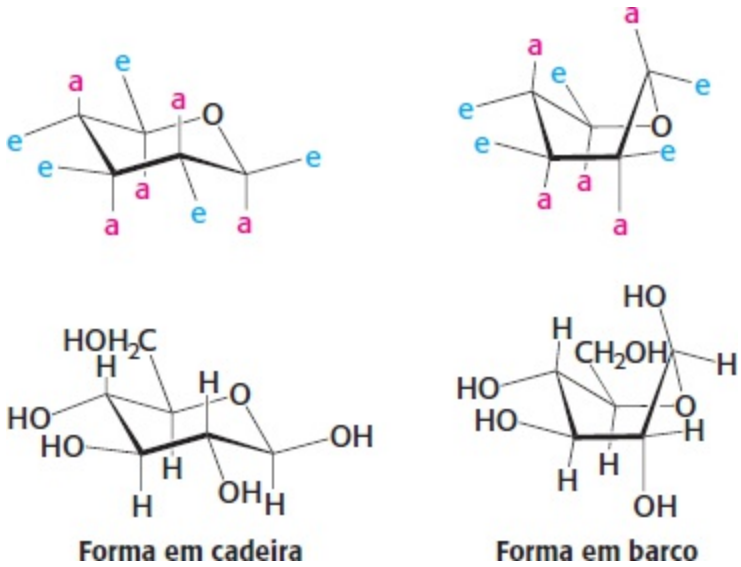


Figura 11.7 Formas em cadeira e em barco da β-D-glicopiranose. A forma em cadeia é mais estável, em virtude do menor impedimento estérico, já que as posições axiais estão ocupadas por átomos de hidrogênio. Abreviaturas: a, axial; e, equatorial.

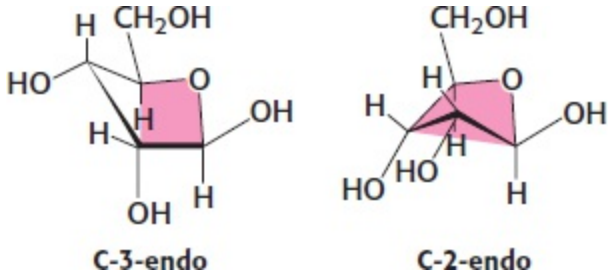
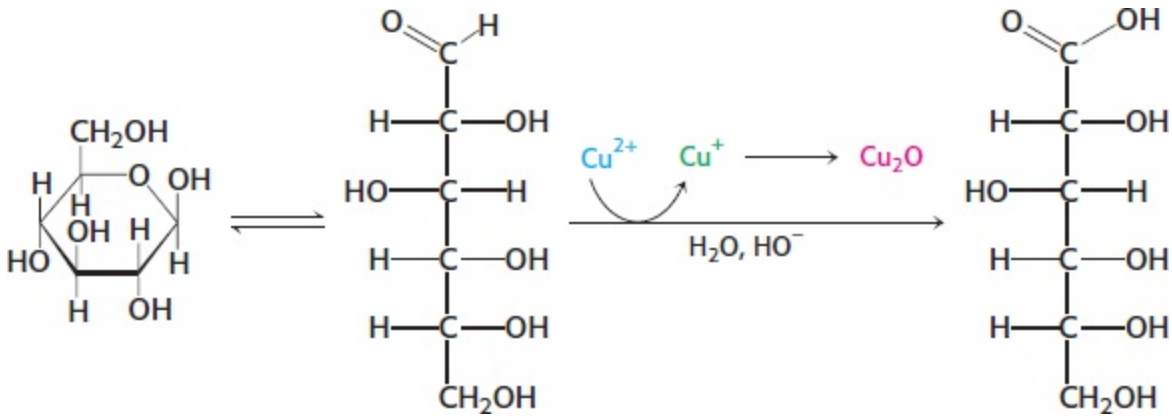


Figura 11.8 Conformações em envelope da β-D-ribose. São mostradas as formas C-3-endo e C-2-endo da β-D-ribose. A cor indica os quatro átomos que se dispõem aproximadamente em um plano.

A glicose é um açúcar redutor

Como os isômeros α e β da glicose encontram-se em um equilíbrio que passa pela forma de cadeia aberta, a glicose apresenta algumas das propriedades químicas dos aldeídos livres, como a capacidade de reagir com agentes oxidantes. Por exemplo, a glicose pode reagir com o íon cúprico (Cu^{2+}), reduzindo-o a íon cuproso (Cu^{+}) enquanto está sendo oxidada a ácido glicônico.



As soluções de íon cúprico (conhecidas como solução de Fehling) fornecem um teste simples para detectar a presença de açúcares, como de glicose. Os açúcares que reagem são denominados *açúcares redutores,* enquanto os que não o fazem são denominados *açúcares não redutores*. Com frequência, os açúcares redutores podem reagir inespecificamente com outras moléculas. Por exemplo, por ser um açúcar redutor, a glicose pode reagir com a hemoglobina, formando a hemoglobina glicosilada. O monitoramento das variações na quantidade de hemoglobina glicosilada constitui um método particularmente útil de avaliar a eficiência do tratamento do diabetes melito, uma condição caracterizada por altos níveis de glicemia (Seção 27.3). Como a hemoglobina glicosilada permanece na circulação, a quantidade de hemoglobina modificada corresponde à regulação a longo prazo – em um período de vários meses – dos níveis de glicose. No indivíduo não diabético, ocorre glicosilação de menos de 6% da hemoglobina, ao passo que, em pacientes com diabetes não controlada, quase 10% da hemoglobina está glicosilada. Embora a glicosilação da hemoglobina não tenha nenhum efeito sobre a ligação do oxigênio e, portanto, seja benigna, reações redutoras semelhantes entre açúcares e outras proteínas frequentemente são prejudiciais ao organismo, visto que as glicosilações alteram a função bioquímica normal das proteínas modificadas. As modificações, conhecidas como produtos finais de glicosilação avançada (AGE, do inglês *advanced glycosylation end products*) foram implicadas no envelhecimento, na arteriosclerose e no diabetes, bem como em outras condições patológicas. AGE é o mesmo nome dado a uma série de

reações entre um grupo amino que não participa de uma ligação peptídica em uma proteína e a forma aldeído de um carboidrato.

Os monossacarídios são unidos a alcoóis e aminas por ligações glicosídicas

As propriedades bioquímicas dos monossacarídios podem ser modificadas pela sua reação com outras moléculas. Essas modificações aumentam a versatilidade bioquímica dos carboidratos, possibilitando a sua atuação como moléculas de sinalização ou tornando-os mais suscetíveis à combustão. Três reagentes comuns são alcoóis, aminas e fosfato. A ligação formada entre o átomo de carbono anomérico da glicose e o átomo de oxigênio de um álcool é denominada *ligação glicosídica* – especificamente uma ligação O-*glicosídica*. As ligações *O* glicosídicas são proeminentes quando os carboidratos são ligados entre si para formar longos polímeros ou quando estão ligados às proteínas. Além disso, o átomo de carbono anômero de um açúcar pode ser ligado ao átomo de nitrogênio de uma amina, formando uma *ligação N-glicosídica*, como aquela encontrada quando bases nitrogenadas são ligadas a unidades de ribose para formar nucleosídios. A Figura 11.9 fornece exemplos de carboidratos modificados.

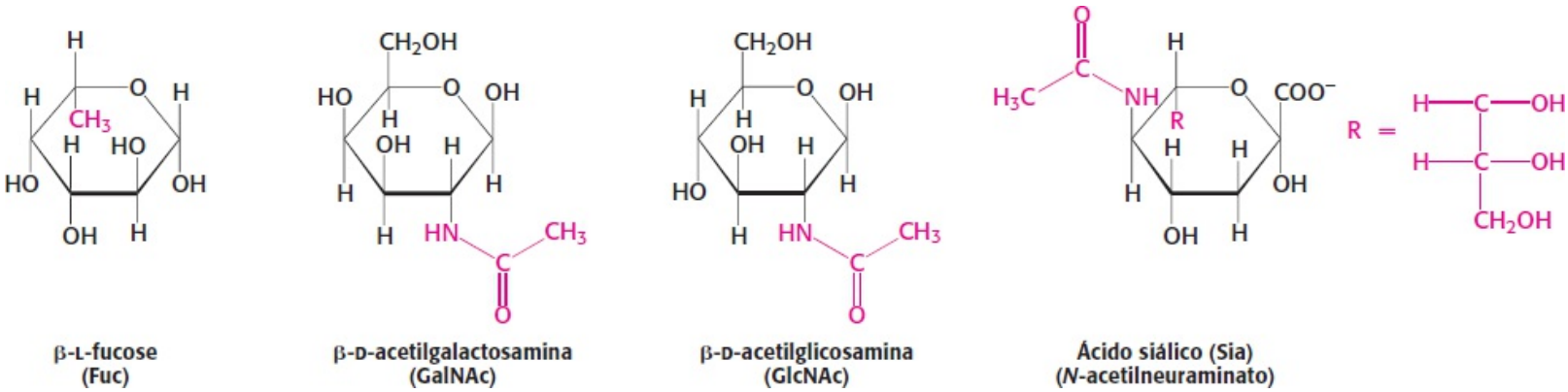
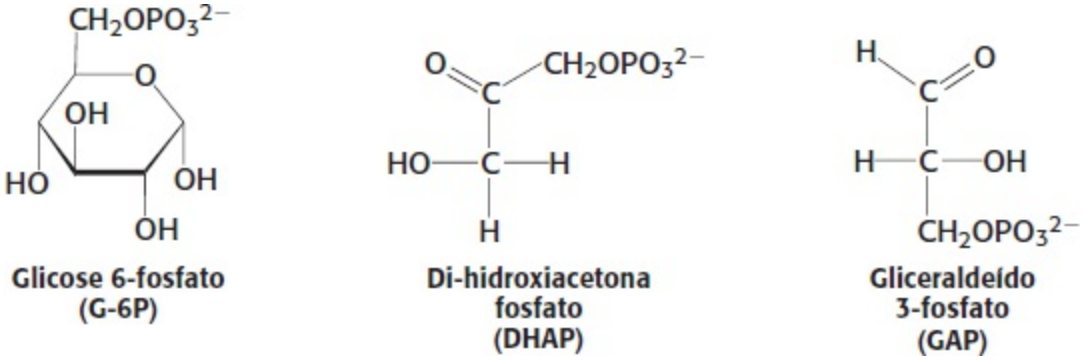


Figura 11.9 Monossacarídios modificados. Os carboidratos podem ser modificados pela adição de substituintes (mostrado em vermelho) diferente dos grupos hidroxila. Esses carboidratos modificados são frequentemente expressos nas superfícies das células.

Os açúcares fosforilados são intermediários essenciais na geração de energia e processos de biossíntese

Uma modificação dos açúcares merece uma observação especial, devido à sua notoriedade no metabolismo. A adição de grupos fosforila é uma modificação comum dos açúcares. Por exemplo, a primeira etapa na degradação da glicose para obter energia é a sua conversão em glicose 6-fosfato. Vários intermediários subsequentes nessa via metabólica, como a di-hidroxiacetona fosfato e o gliceraldeído 3-fosfato, são açúcares fosforilados.



A *fosforilação torna os açúcares aniônicos*; a carga negativa impede que esses açúcares deixem espontaneamente a célula ao atravessar a bicamada lipídica das membranas. A fosforilação também *cria intermediários reativos*, que irão formar mais prontamente ligações com outras moléculas. Por exemplo, um derivado multifosforilado da ribose desempenha papéis essenciais na biossíntese dos nucleotídios purínicos e pirimidínicos (Capítulo 25).

11.2 Os monossacarídios estão ligados entre si para formar carboidratos complexos

Como os açúcares contêm muitos grupos hidroxila, as ligações glicosílicas podem unir um monossacarídio a outro. Os *oligossacarídios* são produzidos pela ligação de dois ou mais monossacarídios por ligações O-glicosídicas (Figura 11.10). Na dissacarídio maltose, por exemplo, dois resíduos de D-glicose são unidos por uma ligação glicosídica entre a forma α anomérica de C-1 de um açúcar e o átomo de oxigênio hidroxila de C-4 do açúcar adjacente. Essa ligação é denominada ligação α-1,4-glicosídica. Assim como as proteínas apresentam uma polaridade definida pelas extremidades aminoterminal e carboxiterminal, os oligossacarídios exibem uma polaridade definida pelas suas extremidades redutora e não redutora. A unidade de carboidrato na extremidade redutora tem um átomo de carbono anomérico livre que possui atividade redutora, visto que pode formar a cadeia aberta, conforme discutido anteriormente (p. 327). Por convenção, essa extremidade do oligossacarídio continua sendo denominada extremidade não redutora, mesmo quando está ligada a outra molécula como uma proteína, não apresentando mais propriedades redutoras.

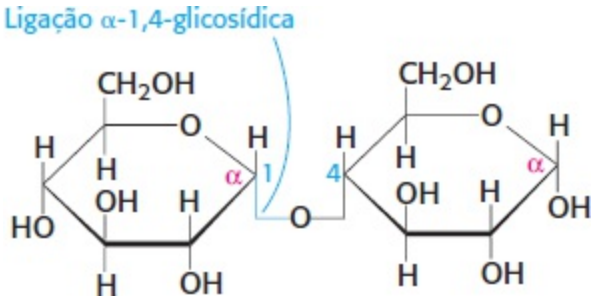


Figura 11.10 Maltose, um dissacarídio. Duas moléculas de glicose são ligadas por uma ligação α-1,4-glicosídica para formar o dissacarídio maltose. Os ângulos nas ligações ao átomo de oxigênio central não denotam átomos de carbono. Os ângulos são formados apenas para facilidade de ilustração. A molécula de glicose à direita é capaz de assumir a forma de cadeia aberta, que é capaz de atuar como agente redutor. A molécula de glicose à esquerda não pode assumir a forma de cadeia aberta, visto que o átomo de carbono C-1 está ligado a outra molécula.

O fato de que os monossacarídios apresentam múltiplos grupos hidroxila significa a possibilidade

de muitas ligações glicosídicas diferentes. Por exemplo, consideremos três monossacarídios – a glicose, a manose e a galactose. Essas moléculas podem ser ligadas umas às outras no laboratório, formando mais de 12.000 estruturas que diferem entre si na ordem dos monossacarídios e dos grupos hidroxila que participam nas ligações glicosídicas. Por exemplo, o grupo hidroxila no carbono 1 de um monossacarídio pode ligar-se aos carbonos 4 ou 6 do monossacarídio seguinte. Nesta seção, examinaremos alguns do oligossacarídios mais comuns encontrados na natureza.

A sacarose, a lactose e a maltose são os dissacarídios comuns

Um *dissacarídio* é constituído de dois açúcares unidos por uma ligação *O*-glicosídica. A sacarose, a lactose e a maltose são três dissacarídios abundantes que encontramos com frequência (Figura 11.11). A sacarose (o açúcar comum de mesa) é obtida comercialmente a partir da cana ou da beterraba. Os átomos de carbono anoméricos de uma unidade de glicose e de frutose estão unidos nesse dissacarídio; a configuração dessa ligação glicosídica é α para a glicose e β para a frutose. A sacarose pode se clivada em seus monossacarídios componentes pela enzima *sacarase*.

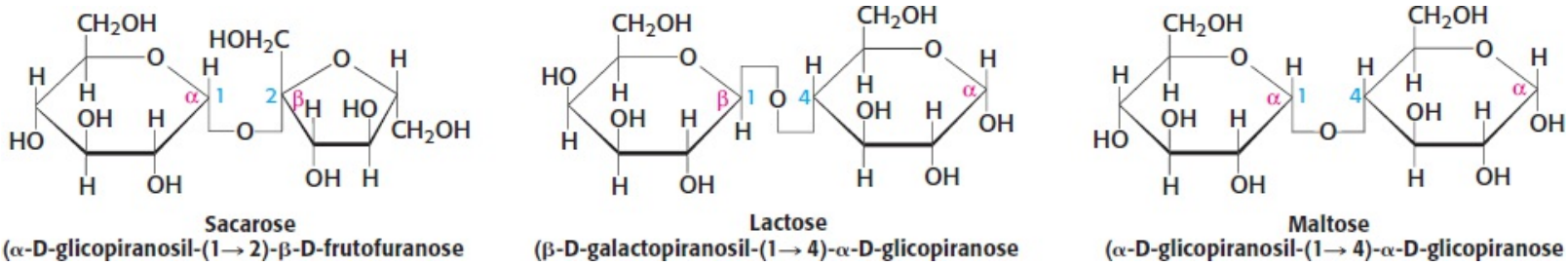


Figura 11.11 Dissacarídios comuns. A sacarose, a lactose e a maltose são componentes comuns da alimentação. Os ângulos nas ligações aos átomos de oxigênio centrais não denotam átomos de carbono.

A *lactose*, o dissacarídio do leite, é constituída de galactose unida à glicose por uma ligação β-1,4-glicosídica. A lactose é hidrolisada a esses monossacarídios pela lactase nos seres humanos e pela β-*galactosidase* nas bactérias. Na *maltose*, duas unidades de glicose são unidas por uma ligação α-1,4-glicosídica. A maltose resulta da hidrólise de grandes oligossacarídios poliméricos, como o amido e o glicogênio, e, por sua vez, é hidrolisada a glicose pela maltase. A sacarase, a lactase e a maltase estão localizadas na superfície externa das células epiteliais que revestem o intestino delgado (Figura 11.12). Os produtos de clivagem da sacarose, da lactose e da maltose podem ser ainda processados para fornecer energia na forma de ATP.

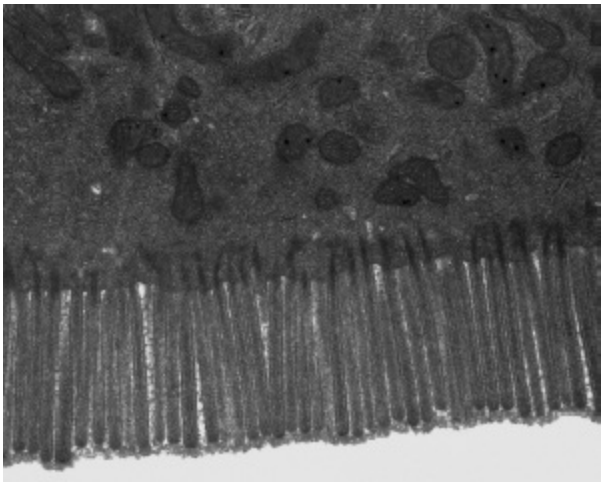


Figura 11.12 Micrografia eletrônica de microvilosidade. A lactase e outras enzimas que hidrolisam carboidratos estão presentes nas microvilosidades que se projetam da face externa da membrana plasmática das células epiteliais do intestino. [De Louisa Howard e Katherine Connolly. Cortesia de Louisa Howard, Dartmouth College.]

O glicogênio e o amido são formas de armazenamento da glicose

A glicose constitui uma importante fonte de energia em praticamente todas as formas de vida. Entretanto, as moléculas de glicose livre não podem ser armazenadas, visto que, se estiver presente em altas concentrações, a glicose perturbará o equilíbrio osmótico da célula, com a consequência potencial de morte celular. A solução é armazenar a glicose como unidades em um grande polímero, que não é osmoticamente ativo.

Os grandes oligossacarídios poliméricos, formados pela ligação de múltiplos monossacarídios, são denominados *polissacarídios* e desempenham papéis vitais no armazenamento da energia e na manutenção de integridade estrutural do organismo. Se todas as unidades de monossacarídio em um polissacarídio forem iguais, o polímero é denominado *homopolímero*. O homopolímero mais comum nas células animais é o *glicogênio*, a forma de armazenamento da glicose. O glicogênio é encontrado na maioria dos nossos tecidos, porém é mais comum no músculo e no fígado. Conforme discutido detalhadamente no Capítulo 21, o glicogênio é um grande polímero ramificado de resíduos de glicose. A maior parte das unidades de glicose no glicogênio é unida por ligações α-1,4-glicosídicas. As ramificações são formadas por ligações α-1,6-glicosídicas, presentes a cerca de cada 10 unidades (Figura 11.13).

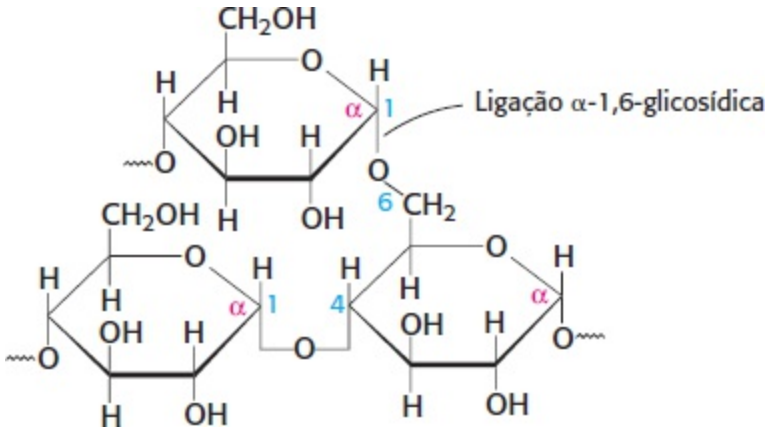


Figura 11.13 Ponto de ramificação do glicogênio. Duas cadeias de moléculas de glicose unidas por ligações α-1,4-glicosídicas estão ligadas por uma ligação α-1,6-glicosídica para criar um ponto de ramificação. Essa ligação α-1,6-glicosídica forma-se a, aproximadamente, cada 10 unidades de glicose, tornando o glicogênio uma molécula altamente ramificada.

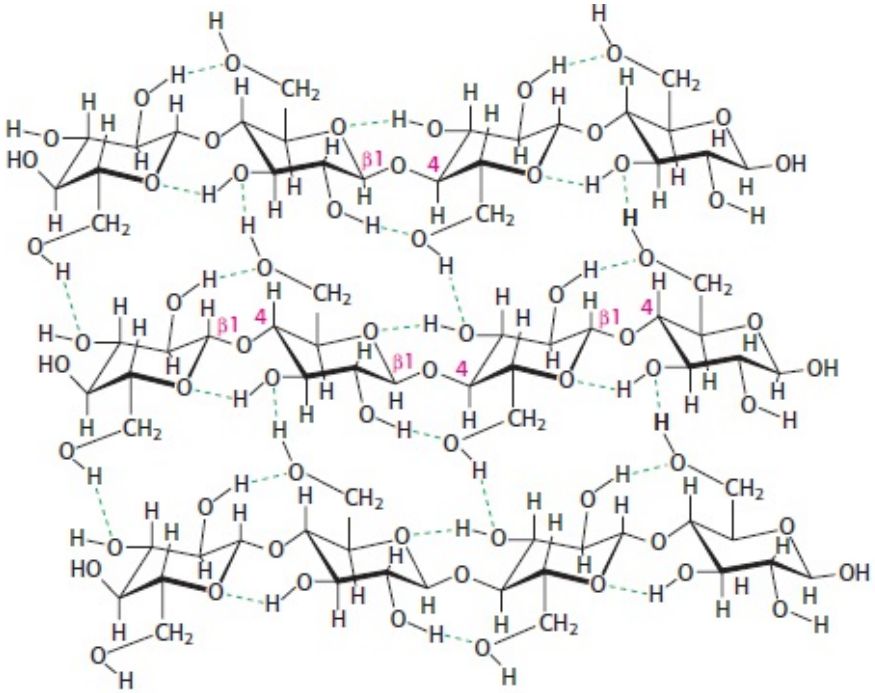
O reservatório nutricional nas plantas é o homopolímero amido, do qual existem duas formas. A *amilose*, o tipo não ramificado de amido, é constituída de resíduos de glicose com ligação α-1,4. A *amilopectina*, a forma ramificada, tem cerca de uma ligação α-1,6para cada 30 ligações α-1,4, de modo semelhante ao glicogênio, exceto por seu menor grau de ramificação. Mais da metade dos carboidratos ingeridos pelos seres humanos consiste em amido encontrado no trigo, nas batatas e no arroz. Para citar apenas algumas fontes. A amilopectina, a amilose e o glicogênio são rapidamente hidrolisados pela α-*amilase*, uma enzima secretada pelas glândulas salivares e pelo pâncreas.

Levamos em conta apenas os homopolímeros de glicose, mas, tendo em vista a variedade de diferentes monossacarídios que podem ser reunidos em qualquer número de arranjos, a quantidade de

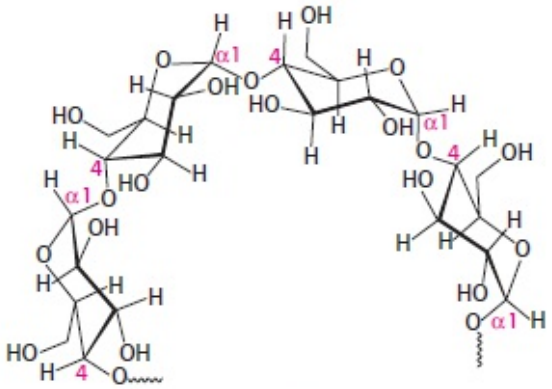
polissacarídios possíveis é enorme. Consideraremos alguns desses polissacarídios de modo sucinto.

A celulose, um componente estrutural das plantas, é constituída por cadeias de glicose

A *celulose*, o outro polissacarídio importante de glicose encontrado nas plantas, desempenha um papel mais estrutural do que nutricional como importante componente da parede celular das plantas. *A celulose está entre os compostos orgânicos mais abundantes da biosfera*. Cerca de 10^{15} kg de celulose são sintetizados e degradados na Terra a cada ano, uma quantidade 1.000 vezes maior do que o peso combinado da raça humana. A celulose é um polímero não ramificado de resíduos de glicose unidos por ligações β-1,4, diferentemente da ligação α-1,4 observada no amido e no glicogênio. Essa simples diferença na estereoquímica produz duas moléculas com propriedades e funções fisiológicas extremamente diferentes. A configuração β faz com que a celulose possa formar cadeias retilíneas muito longas. As fibrilas são formadas por cadeias paralelas, que interagem umas com as outras por pontes de hidrogênio, produzindo uma estrutura rígida de suporte. As cadeias retilíneas formadas por ligações β são ideais para a construção de fibrilas com alta resistência à tensão. As ligações α-1,4 no glicogênio e no amido produzem uma arquitetura molecular muito diferente: forma-se uma hélice oca em lugar de uma cadeia retilínea (Figura 11.14). A hélice oca formada por ligações α é bem apropriada para o armazenamento de uma forma mais compacta e acessível de açúcar. Embora os mamíferos careçam de celulase e, portanto, sejam incapazes de digerir fibras da madeira e vegetais, a celulose e outras fibras vegetais ainda representam um importante constituinte da alimentação dos mamíferos como componente das fibras alimentares. As fibras solúveis, como a *pectina* (ácido poligalacturônico) tornam o movimento do alimento mais lento pelo trato gastrintestinal, possibilitando melhor digestão e absorção dos nutrientes. As fibras insolúveis, como a celulose, aumentam a velocidade pela qual os produtos da digestão passam pelo intestino grosso. Esse aumento de velocidade pode minimizar a disposição às toxinas presentes na alimentação. A celulose está sendo atualmente investigada com fonte potencial de etanol para biocombustíveis.

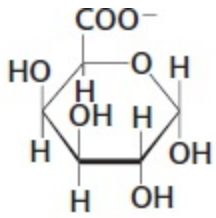


Celulose
(ligações β-1,4)



Amido e glicogênio
(ligações α-1,4)

Figura 11.14 Ligações glicosídicas determinam a estrutura do polissacarídio. As ligações β-1,4 favorecem cadeias retilíneas, que são ideais para fins estruturais. As ligações α-1,4 favorecem estruturas curvadas, que são mais apropriadas para armazenamento.

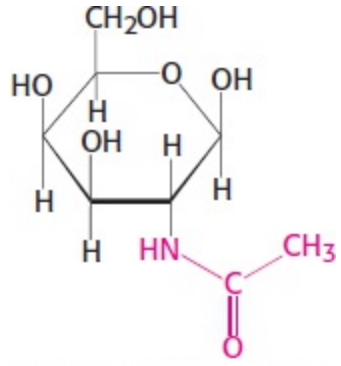


Ácido galacturônico

11.3 Os carboidratos podem ligar-se às proteínas para formar glicoproteínas

Um grupo carboidrato pode ligar-se covalentemente a uma proteína, formando uma glicoproteína. Examinemos três classes de glicoproteínas. A primeira classe é simplesmente designada como glicoproteínas, das quais a proteína constitui o maior componente por peso. Essa classe versátil desempenha uma variedade de funções bioquímicas. Muitas glicoproteínas são componentes das membranas celulares, onde participam de vários processos, como adesão celular e ligação dos espermatozoides aos óvulos. Outras glicoproteínas são formadas pela ligação de carboidratos a proteínas solúveis; em particular, muitas das proteínas secretadas das células são glicosiladas ou modificadas pela ligação de carboidratos, incluindo a maioria das proteínas presentes no soro do sangue.

A segunda classe de glicoproteínas compreende os *proteoglicanos*. O componente proteico dos proteoglicanos é conjugado com um tipo particular de polissacarídio, denominado *glicosaminoglicano*. Os carboidratos representam uma porcentagem muito maior por peso do proteoglicano em comparação com as glicoproteínas simples. Os proteoglicanos atuam como componentes estruturais e como lubrificantes.



β-D-acetilgalactosamina
(GalNAc)

À semelhança dos proteoglicanos, as *mucinas* ou *mucoproteínas* são constituídas predominantemente de carboidratos. A *N*-acetilgalactosamina é habitualmente carboidrato ligado à proteína nas mucinas. A *N*-acetilgalactosamina é um exemplo de um *amino açúcar*, assim designado pela substituição de um grupo hidroxila por um grupo amino. As mucinas, que são um componente essencial do muco, atuam como lubrificantes.

A glicosilação aumenta acentuadamente a complexidade do proteoma. Uma determinada proteína com vários sítios potenciais de glicosilação pode exibir muitas formas glicosiladas diferentes (algumas vezes denominadas *glicoformas*), e cada uma delas pode ser gerada apenas em um tipo celular ou estágio de desenvolvimento específico.

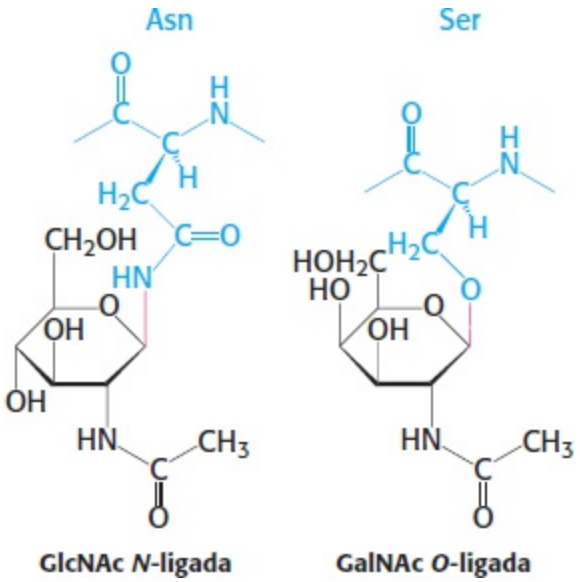


Figura 11.15 Ligações glicosídicas entre proteínas e carboidratos. Uma ligação glicosídica liga um carboidrato à cadeia lateral da asparagina (*N*-ligado) ou à cadeia lateral da serina ou treonina (*O*-ligado). As ligações glicosídicas são mostradas em vermelho.

Os carboidratos podem ser ligados às proteínas por meio de resíduos de asparagina (N-ligados) ou de serina ou treonina (O-ligados)

Os açúcares nas glicoproteínas são unidos ao átomo de nitrogênio amídico na cadeia lateral da asparagina (N-*ligação*) ou ao átomo de oxigênio na cadeia lateral de serina ou treonina (O-*ligação*), conforme ilustrado na Figura 11.15. Um resíduo de asparagina só pode aceitar um oligossacarídio se ele fizer parte de uma sequência Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr, em que X pode ser qualquer resíduo, exceto prolina. Por conseguinte, sítios potenciais de glicosilação podem ser detectados dentro das

sequências de aminoácidos. Todavia, nem todos os sítios potenciais são glicosilados. Os sítios específicos que serão glicosilados dependem de outros aspectos da estrutura da proteína e do tipo de célula na qual essa proteína é expressa. Todos os oligossacarídios *N*-ligados têm em comum um cerne pentassacarídico constituído de três resíduos de manose e dois resíduos de N-acetilglicosamina. Outros açúcares são ligados a esse cerne, formando a grande variedade de padrões de oligossacarídios encontrados nas glicoproteínas (Figura 11.16).

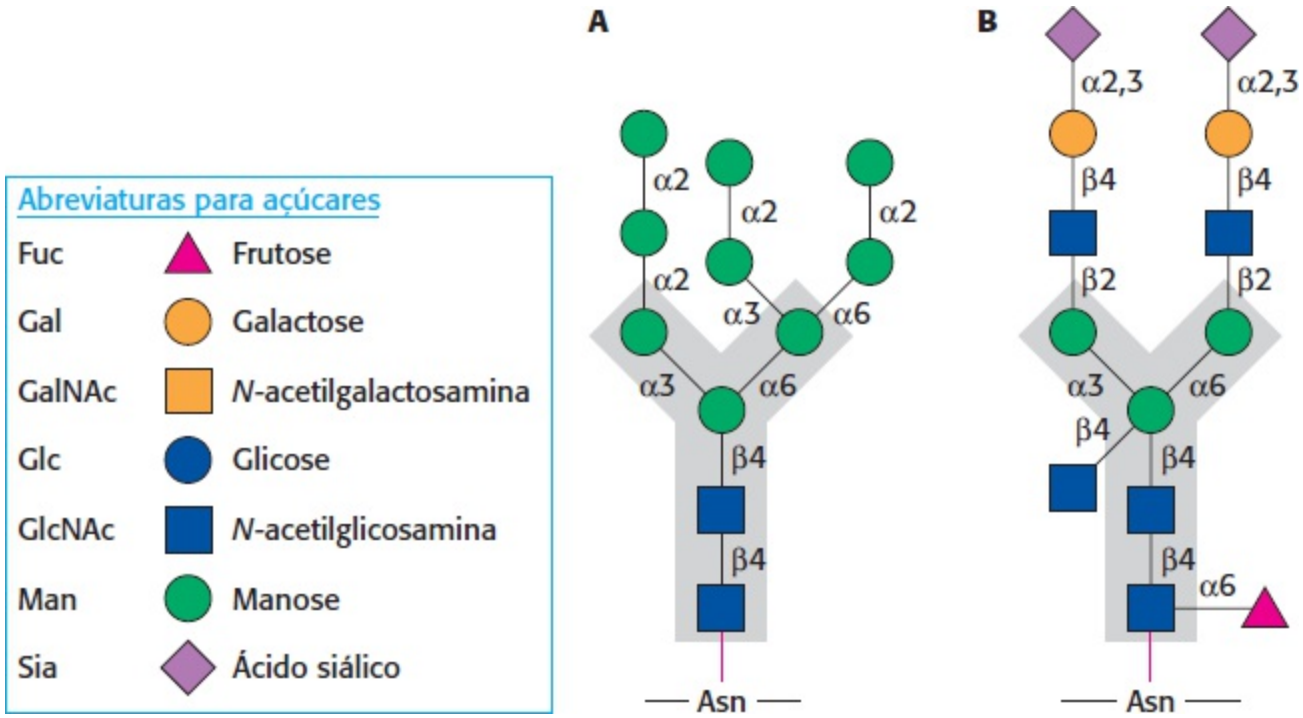


Figura 11.16 Oligossacarídios *N*-ligados. Um cerne de pentassacarídio (sombreado em cinza) é comum a todos os oligossacarídios *N*-ligados e atua como base para uma ampla variedade de oligossacarídios *N*-ligados, dois dos quais estão ilustrados: (**A**) tipo rico em manose; (**B**) tipo complexo.

A glicoproteína eritropoetina é um hormônio vital

Examinemos uma glicoproteína presente no soro sanguíneo, que melhorou radicalmente o tratamento da anemia, em particular a anemia induzida pela quimioterapia do câncer. A eritropoetina (EPO), um hormônio glicoproteico, é secretada pelos rins e estimula a produção dos eritrócitos. A EPO é constituída de 165 aminoácidos e é *N*-glicosilada em três resíduos de asparagina e *O*-glicosilada em um resíduo de serina (Figura 11.17). A EPO madura tem 40% de carboidrato por peso, e a glicosilação aumenta a estabilidade da proteína no sangue. A proteína não glicosilada tem apenas cerca de 10% da bioatividade da forma glicosilada, visto que a proteína é rapidamente removida do sangue pelos rins. A disponibilidade de EPO humana recombinante ajudou muito no tratamento das anemias. Todavia, alguns atletas de resistência têm usado a EPO humana recombinante para aumentar a contagem de eritrócitos e, portanto, a sua capacidade de transporte de oxigênio. Os laboratórios toxicológicos são capazes de distinguir algumas formas de EPO humana recombinante proibida da EPO natural em atletas, detectando diferenças em seus padrões de glicosilação por meio de focalização isoelétrica (p. 75).

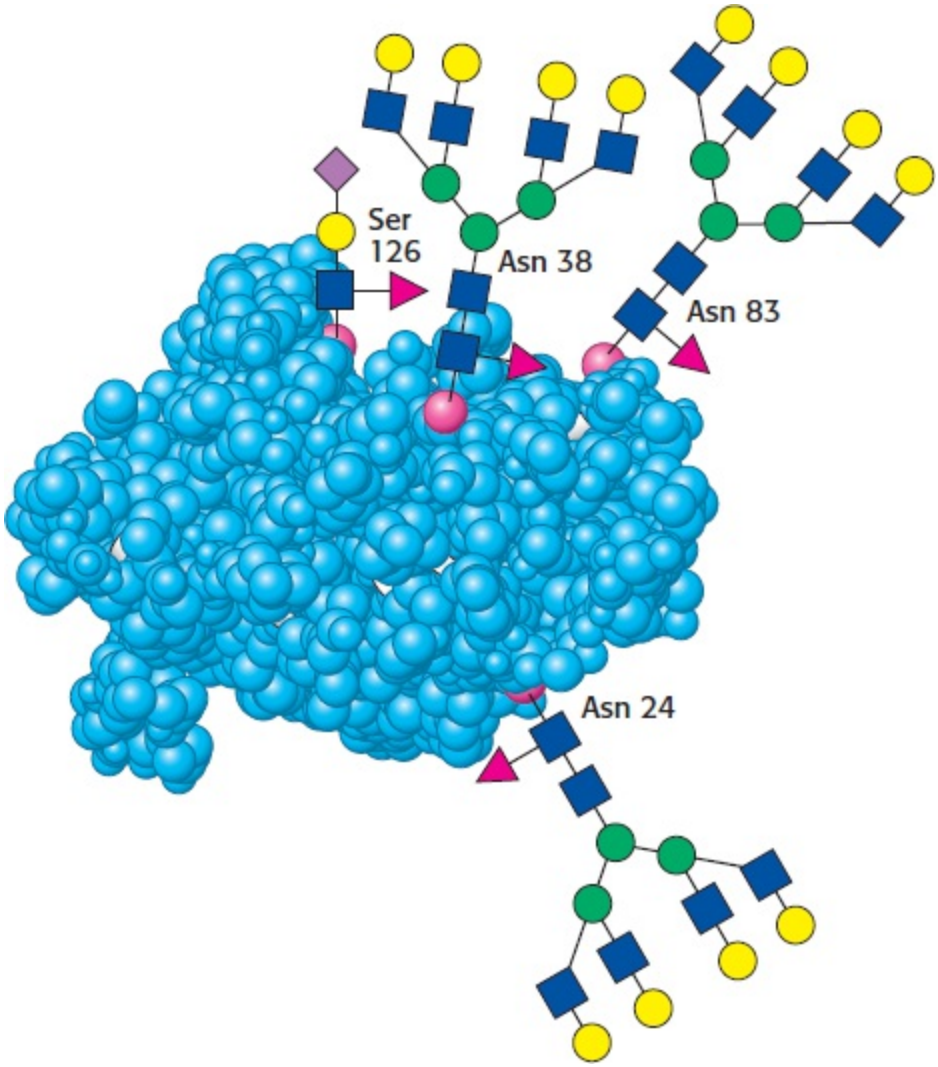


Figura 11.17 Oligossacarídios ligados à eritropoetina. A eritropoetina tem oligossacarídios ligados a três resíduos de asparagina e a um resíduo de serina. As estruturas mostradas estão aproximadamente na escala. Veja a chave dos carboidratos na Figura 11.16. [Desenhada a partir de 1BUY.pdf.]

Os proteoglicanos, que são compostos de polissacarídios e proteína, desempenham papéis estruturais importantes

Conforme assinalado anteriormente, os proteoglicanos são proteínas ligadas a glicosaminoglicanos. O glicosaminoglicano constitui até 95% da biomolécula por peso e, portanto, o proteoglicano assemelha-se mais a um polissacarídio do que a uma proteína. Os proteoglicanos não apenas funcionam como lubrificantes e componentes estruturais do tecido conjuntivo, mas também medeiam a adesão das células à matriz extracelular e ligam fatores que estimulam a proliferação celular.

As propriedades dos proteoglicanos são determinadas principalmente pelo componente glicosaminoglicano. Muitos glicosaminoglicanos são constituídos por unidades repetidas de dissacarídios contendo um derivado de amino açúcar, a glicosamina ou a galactosamina (Figura 11.18).

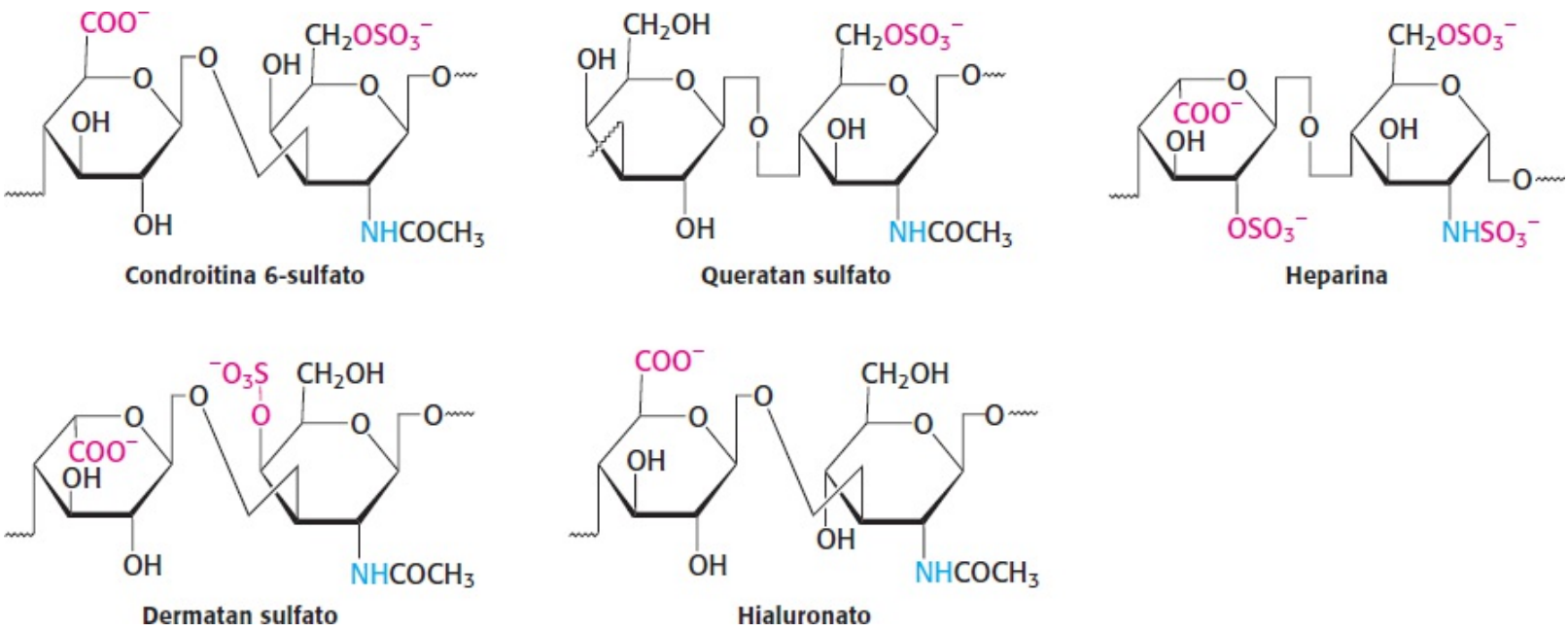


Figura 11.18 Unidades repetitivas nos glicosaminoglicanos. As fórmulas estruturais para cinco unidades repetitivas de glicosaminoglicanos importantes ilustram a variedade de modificações e de ligações possíveis. Os grupos amino são mostrados em azul e os grupos de carga negativa, em vermelho. Para maior clareza, foram omitidos os átomos de hidrogênio. A estrutura à direita é um derivado de glicosamina em cada caso.

Figura 11.19 Doença de Hurler. Antigamente denominada gargoilismo, a doença de Hurler é uma mucopolissacaridose, cujos sinais consistem em narinas largas, ponte nasal deprimida, lábios e lóbulos das orelhas espessos e dentes irregulares. Na doença de Hurler, os glicosaminoglicanos não podem ser degradados. O excesso dessas moléculas é armazenado nos tecidos moles da região facial, resultando nos traços faciais característicos. [Cortesia de National MPS Society, www.mpssosiety.org.]

Pelo menos um dos dois açúcares na unidade repetitiva tem um *grupo carboxilado ou sulfatado de carga negativa*. Os principais glicosaminoglicanos nos animais são a condroitina sulfato, o queratan sulfato, a heparina, o heparan sulfato, o dermatan sulfato e o hialuronato. As *mucopolissacaridoses* representam um conjunto de doenças, como a doença de Hurler, que resultam da incapacidade de degradar os glicosaminoglicanos (Figura 11.19). Embora as características clínicas precisas variem de acordo com a doença, as mucopolissacaridoses resultam em deformidade

do esqueleto e redução da expectativa de vida.

Os proteoglicanos são importantes componentes da cartilagem

Entre os membros mais bem caracterizados dessa classe diversificada destaca-se o proteoglicano na matriz extracelular da cartilagem. O proteoglicano *agrecano* e a proteína *colágeno* são componentes essenciais da cartilagem. A hélice tríplice do colágeno (p. 45) fornece estrutura e resistência à tensão, enquanto o agrecano atua como elemento de absorção de choque. O componente proteico do agrecano é uma grande molécula constituída de 2.397 aminoácidos. A proteína tem três domínios globulares, e o sítio de ligação ao glicosaminoglicano é a região extensa compreendida entre os domínios globulares 2 e 3. Essa região linear contém sequências de aminoácidos altamente repetitivas, que são locais para a ligação do queratan sulfato e condroitina sulfato. Por sua vez, muitas moléculas de agrecano estão ligadas não covalentemente por meio do primeiro domínio globular a um filamento muito longo formado pela união de moléculas de hialuronano, um glicosaminoglicano (Figura 11.20). A água liga-se aos glicosaminoglicanos, atraída pelas numerosas cargas negativas. O agrecano pode amortecer forças compressivas, visto que a água absorvida possibilita a sua retração após ter sido deformada. Quando se exerce pressão, como quando a sola do pé bate no chão enquanto caminha, a água é espremida para fora do glicosaminoglicano, amortecendo o impacto. Quando a pressão é aliviada, a água volta a se ligar. A *osteoartrite* pode resultar da degradação proteolítica do agrecano e do colágeno na cartilagem.

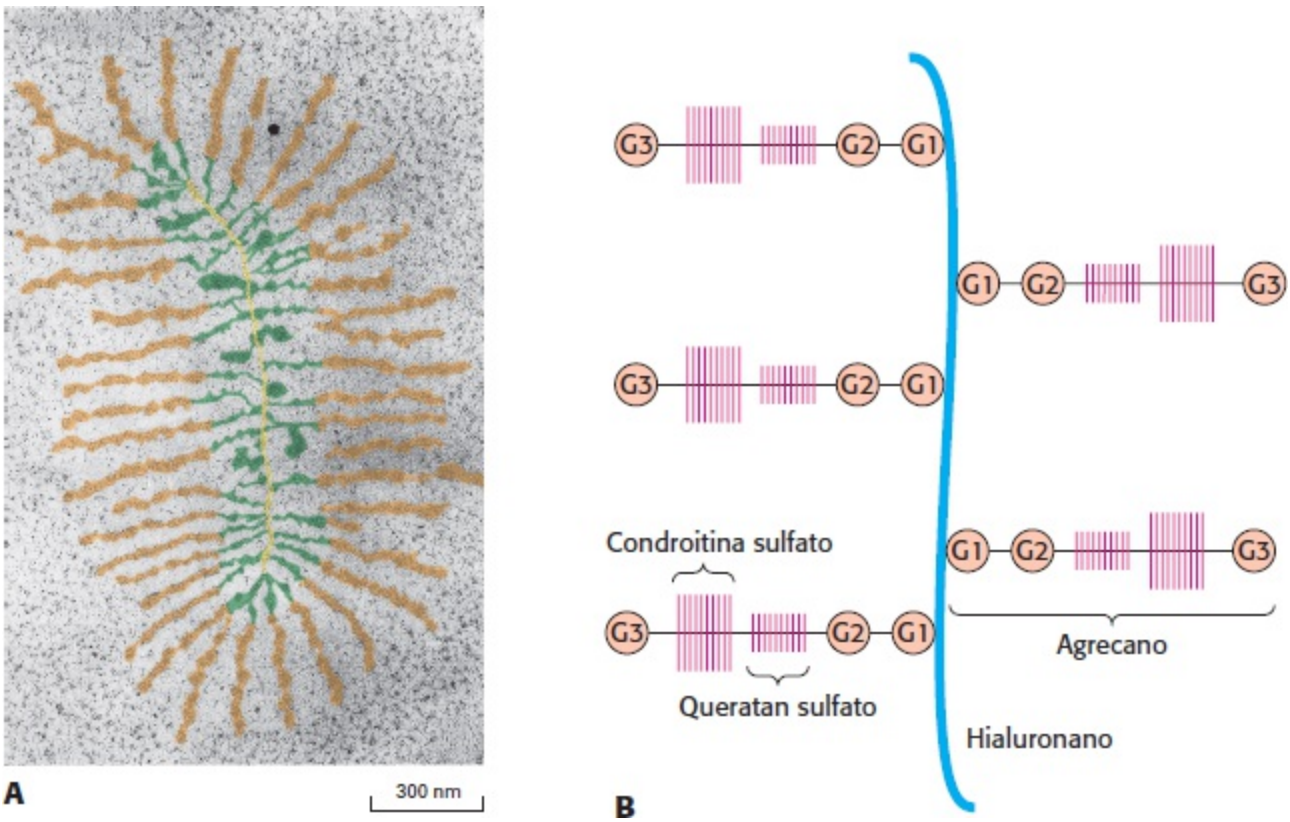


Figura 11.20 Estrutura do proteoglicano da cartilagem. A. Micrografia eletrônica de um proteoglicano da cartilagem (com cores falsas adicionadas). Os monômeros de proteoglicanos emergem lateralmente, a intervalos regulares dos lados opostos de um filamento central de hialuronano. **B.** Representação esquemática. G = domínio globular. [(A) Cortesia do Dr. Lawrence Rosenberg. De J. A. Buckwalter and L. Rosenberg. *Collagen Relat. Res*. 3:489-504, 1983.]

Além de serem um componente-chave dos tecidos estruturais, os glicosaminoglicanos são comuns

em toda biosfera. A quitina é um glicosaminoglicano encontrado no exoesqueleto dos insetos, crustáceos e aracnídeos e, depois da celulose, é o segundo polissacarídio mais abundante da natureza (Figura 11.21).

Figura 11.21 A quitina, um glicosaminoglicano, é encontrada nas asas e no exoesqueleto dos insetos. Os glicosaminoglicanos são componentes do exoesqueleto dos insetos, crustáceos e aracnídeos. [FLPA/Alamy.]

As mucinas são componentes glicoproteicos do muco

Conforme assinalado anteriormente, outra classe de glicoproteínas é constituída pelas mucinas (mucoproteínas). Nas mucinas, a proteína componente é extensamente glicosilada nos resíduos de serina ou de treonina pela N-acetilgalactosamina (ver Figura 11.9). As mucinas são capazes de formar grandes estruturas poliméricas e são comuns nas secreções mucosas. Essas glicoproteínas são sintetizadas por células especializadas nos tratos traqueobrônquico, gastrintestinal e geniturinário. Como a principal função das mucinas consiste em atuar como lubrificantes, elas são abundantes na saliva.

A Figura 11.22A mostra um modelo de uma mucina. A característica que define as mucinas é uma região do arcabouço da proteína, denominada região de *número variável de repetições em série* (VNTR, do inglês *variable number of tandem repeats*), que é rica em resíduos de serina e de treonina que são *O*-glicosilados. Com efeito, a fração de carboidrato pode representar até 80% da molécula por peso. Várias estruturas de carboidratos do cerne são conjugadas à proteína componente da mucina. A Figura 11.22B mostra esse tipo de estrutura.

As mucinas aderem às células epiteliais e atuam como barreira protetora; além disso, elas hidratam as células subjacentes. Além de proteger as células de agressões ambientais, como o ácido gástrico, substâncias químicas inaladas nos pulmões e infecções bacterianas, as mucinas desempenham um papel na fecundação, na resposta imune e na adesão celular. As mucinas estão hiperexpressas na bronquite e na cirrose cística, e a hiperexpressão de mucinas é característica dos adenocarcinomas – cânceres das células glandulares de origem epitelial.

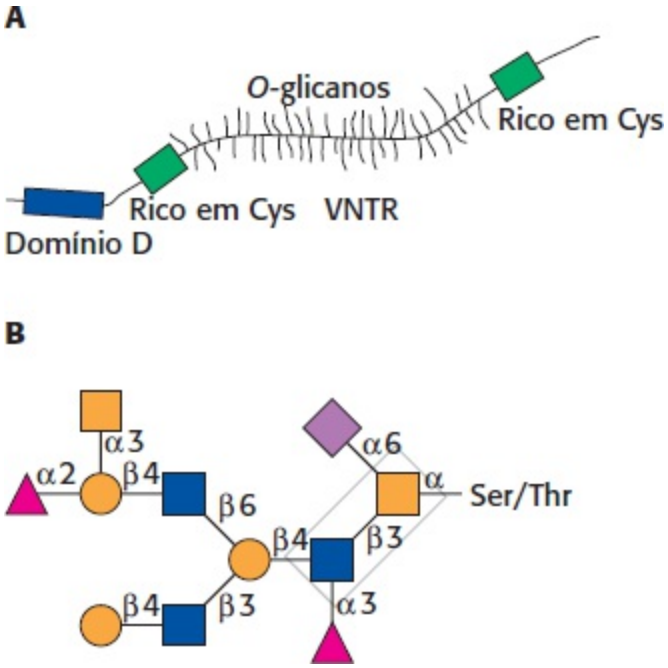


Figura 11.22 Estrutura da mucina. A. Representação esquemática de uma mucoproteína. A região VNTR é altamente glicosilada, forçando a molécula a assumir uma conformação estendida. Os domínios ricos em Cys e o domínio D facilitam a polimerização de muitas dessas moléculas. **B.** Exemplo de um oligossacarídio ligado à região VNTR da proteína. [De A. Varki *et al.* (Eds.), *Essentials of Glycobiology*, 2d ed. (Cold Spring Harbor Press, 2009), pp. 117, 118.]

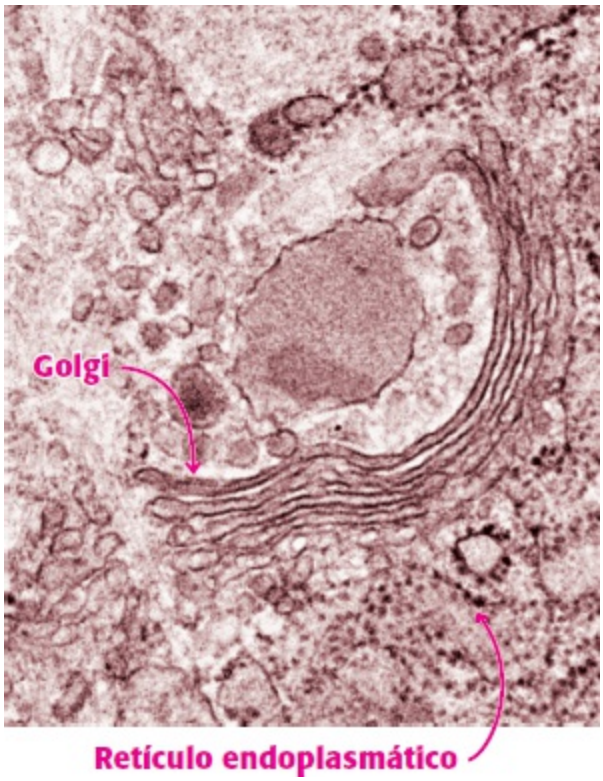
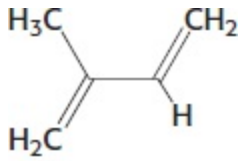


Figura 11.23 Complexo de Golgi e retículo endoplasmático. A micrografia eletrônica mostra o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático adjacente. Os pontos pretos na superfície citoplasmática da membrana do RE são ribossomos. [Micrografia cortesia de Lynne Mercer.]

A glicosilação de proteínas ocorre no lúmen do retículo endoplasmático e no complexo de Golgi

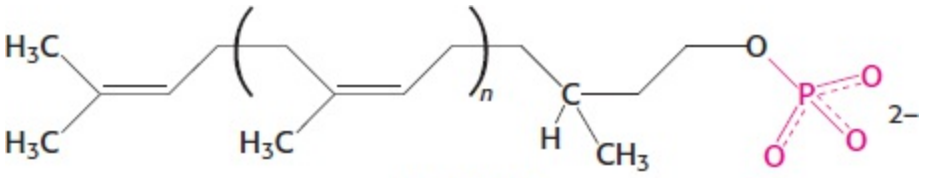
As principais vias de glicosilação de proteínas são o lúmen do *retículo endoplasmático* (RE) e o *complexo de Golgi*, duas organelas que desempenham papéis fundamentais no tráfego das proteínas

(Figura 11.23). A proteína é sintetizada por ribossomos fixados à face citoplasmática da membrana do RE, e a cadeia peptídica é inserida no lúmen do RE (Seção 30.6). A glicosilação *N*-ligada começa no RE e continua no complexo de Golgi, enquanto a glicosilação *O*-ligada ocorre exclusivamente no complexo de Golgi.



Isopreno

Um grande oligossacarídio destinado à ligação ao resíduo de asparagina de uma proteína é montado no *dolicol fosfato*. Uma molécula lipídica especializada, localizada na membrana do RE e contendo cerca de 20 unidades de isopreno (C_5).



n = 15–19

Dolicol fosfato

O grupo fosfato terminal do dolicol fosfato constitui o sítio de ligação do oligossacarídio ativado, que é subsequentemente transferido a um resíduo específico de asparagina da cadeia polipeptídica em crescimento. Tanto os açúcares ativados quanto o complexo enzimático responsável pela transferência do oligossacarídio à proteína localizam-se no lado luminal do RE. Por conseguinte, as proteínas no citoplasma não são glicosiladas por essa via.

As proteínas no lúmen do RE e na sua membrana são transportadas até o complexo de Golgi, que consiste em uma pilha de sacos membranosos achatados. *As unidades de carboidrato das glicoproteínas são alteradas e elaboradas no complexo de Golgi*. As unidades de açúcar *O*-ligadas são produzidas nesse local, enquanto os açúcares N-ligados, provenientes do RE como componente de uma glicoproteína, são modificados de diferentes maneiras. *O complexo de Golgi é o principal centro de ordenação da célula*. As proteínas prosseguem do complexo de Golgi para os lisossomos, os grânulos secretores ou a membrana plasmática, de acordo com sinais codificados dentro de suas sequências de aminoácidos e suas estruturas tridimensionais (Figura 11.24).

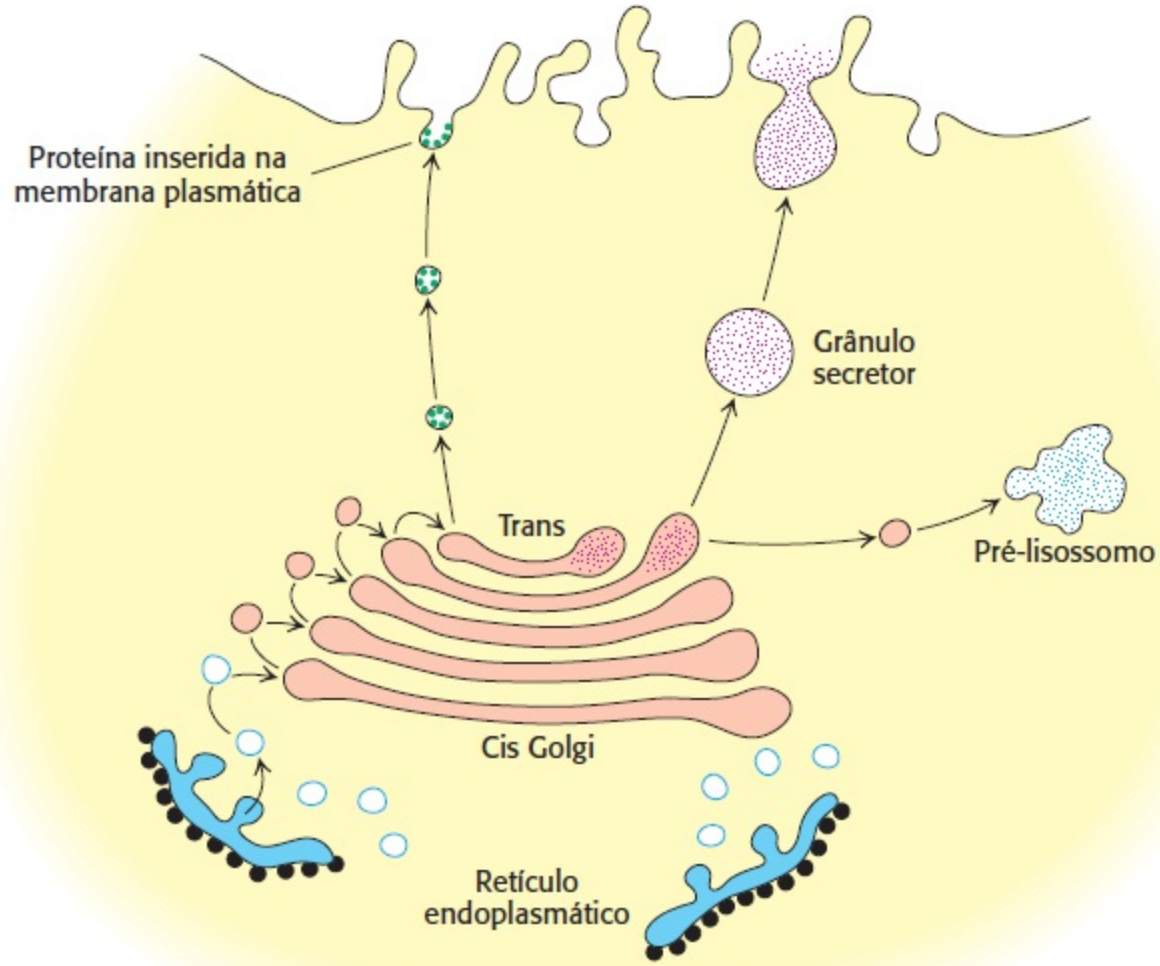


Figura 11.24 O complexo de Golgi como centro de ordenação. O complexo de Golgi é o centro de ordenação do endereçamento de proteínas para os lisossomos, as vesículas secretoras e a membrana plasmática. A face cis do complexo de Golgi recebe vesículas do retículo endoplasmático, enquanto a face trans envia um conjunto diferente de vesículas para os locais-alvo. As vesículas também transferem proteínas de um compartimento do complexo de Golgi para outro. [Cortesia da Dra. Marilyn Farquhar.]

Enzimas especificas são responsáveis pela montagem dos oligossacarídios

Como os carboidratos complexos são formados, sejam eles moléculas não conjugadas, como glicogênio, ou componentes de glicoproteínas? Os carboidratos complexos são sintetizados por meio da ação de enzimas específicas, as *glicosiltransferases*, que catalisam a formação de ligações glicosídicas. Tendo em vista a diversidade das ligações glicosídicas conhecidas, são necessárias muitas enzimas distintas. Com efeito, as glicosiltransferases representam 1 a 2% dos produtos gênicos em todos os organismos examinados.

A forma geral da reação da reação catalisada por uma glicosiltransferase é mostrada na Figura 11.25. O açúcar a ser acrescentado chega na forma de um nucleotídio de açúcar ativado (rico em energia), como UDP-glicose (UDP é a abreviatura de uridina difosfato). A ligação de um nucleotídio para aumentar o conteúdo de energia de uma molécula constitui uma estratégia comum na biossíntese, que veremos muitas vezes em nosso estudo de bioquímica. Os substratos aceptores para as glicosiltransferases são muito variados e incluem carboidratos, resíduos de serina, treonina e asparagina de proteínas, lipídios e, até mesmo, ácidos nucleicos.

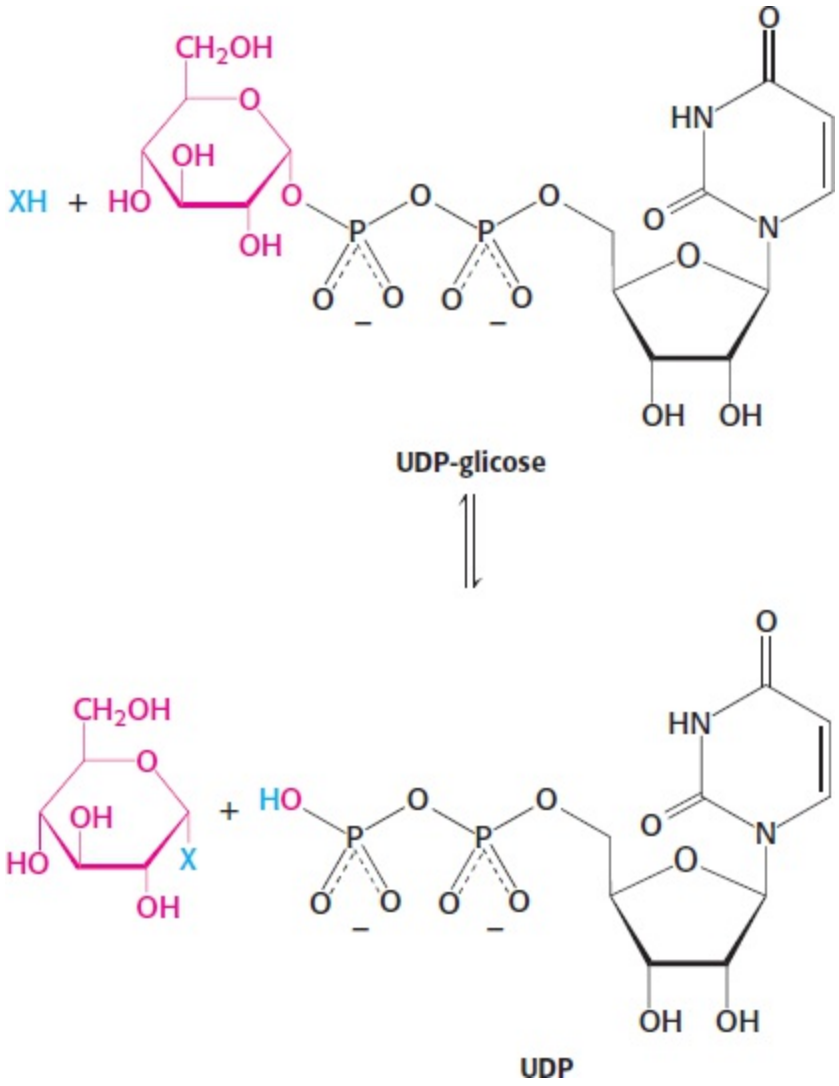


Figura 11.25 Forma geral de uma reação de glicosiltransferase. O açúcar a ser adicionado provém de um nucleotídio de açúcar – neste caso, UDP-glicose. O aceptor, designado como X nesta ilustração, pode ser uma de várias biomoléculas, incluindo outros carboidratos ou proteínas.

Os grupos sanguíneos baseiam-se em padrões de glicosilação de proteínas

Os grupos sanguíneos ABO humanos ilustram os efeitos das glicosiltransferases sobre a formação de glicoproteínas. Cada grupo sanguíneo é designado pela presença de um dos três carboidratos diferentes, denominados A, B ou O, ligados a glicoproteínas e glicolipídios sobre a superfície dos eritrócitos (Figura 11.26). Essas estruturas têm em comum uma base oligossacarídica, denominada antígeno O (ou, algumas vezes, H). Os antígenos A e B diferem do antígeno O pela adição de um monossacarídio extra, a *N*-acetilgalactosamina (para o A) ou galactose (para o B), por meio de uma ligação α-1,3 a uma fração da galactose do antígeno O.

Glicosiltransferases específicas adicionam o monossacarídio extra ao antígeno O. Cada indivíduo herda de cada genitor o gene para uma glicosiltransferase desse tipo. A transferase tipo A adiciona especificamente a *N*-acetilgalactosamina, enquanto a transferase tipo B acrescenta galactose. Essas enzimas são idênticas em todas as posições, exceto quatro das 354. O fenótipo O resulta de uma mutação que leva à terminação prematura da tradução e, portanto, à falta de produção de ambas as glicosiltransferases necessárias.

Essas estruturas têm importantes implicações nas transfusões de sangue e em outros procedimentos de transplante. Se um antígeno normalmente não presente em um indivíduo for introduzido, o sistema

imune desse indivíduo irá reconhecê-lo como estranho. Ocorre rápida lise dos eritrócitos, levando a uma acentuada queda da pressão arterial (hipotensão), choque, insuficiência renal e morte por colapso circulatório.

Por que diferentes tipos sanguíneos estão presentes na população humana? Suponhamos que um organismo patogênico, como um parasito, expresse em sua superfície celular um antígeno de carboidrato semelhante a um dos antígenos de grupo sanguíneo. Esse antígeno pode não ser prontamente detectado como estranho em uma pessoa cujo tipo sanguíneo seja correspondente ao antígeno do parasito, de modo que este irá se multiplicar. Entretanto, outras pessoas com diferentes tipos sanguíneos serão protegidas. Por conseguinte, haverá uma pressão seletiva sobre os seres humanos para variar o tipo sanguíneo, de modo a impedir o mimetismo parasitário, e uma pressão seletiva correspondente sobre os parasitos para aumentar o mimetismo. Essa constante "queda de braço" entre microrganismos patogênicos e seres humanos impulsiona a evolução da diversidade dos antígenos de superfície na população humana.

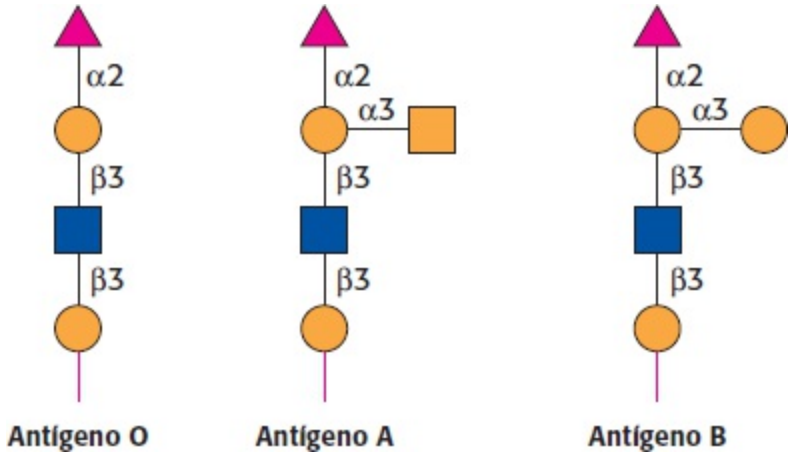


Figura 11.26 Estruturas dos antígenos oligossacarídicos A, B e O. As estruturas de carboidratos mostradas são representadas simbolicamente quando do emprego de um esquema (ver a chave na Figura 11.16) que está se tornando amplamente utilizado.

Erros na glicosilação podem resultar em condições patológicas.

Embora o papel da ligação de carboidratos às proteínas não seja conhecido de modo detalhado na maioria dos casos, os dados disponíveis indicam que essa glicosilação é importante no processamento e estabilidade dessas proteínas, assim como para a EPO. Por exemplo, certos tipos de distrofia muscular podem ser atribuídos a uma glicosilação inadequada das proteínas de membranas. Com efeito, foi identificada toda uma família de doenças hereditárias humanas graves, denominadas *distúrbios congênitos da glicosilação*. Essas condições patológicas revelam a importância da modificação apropriada das proteínas por carboidratos e seus derivados.

Um exemplo particularmente claro do papel desempenhado pela glicosilação é fornecido pela *doença da célula I* (também denominada *mucolipidose II*), uma doença de armazenamento lisossômico. Normalmente, um marcador de carboidrato direciona certas enzimas digestivas do complexo de Golgi para os lisossomos, onde elas normalmente funcionam. Os lisossomos são organelas que degradam e reciclam componentes celulares lesionados ou material introduzido na célula por endocitose. Em pacientes com doença da célula "I", os lisossomos contêm grandes

inclusões de glicosaminoglicanos e glicolipídios não digeridos – explicando o "I" no nome da doença. Essas inclusões estão presentes devido à ausência, nos lisossomos afetados, das enzimas normalmente responsáveis pela degradação dos glicosaminoglicanos. De modo notável, as enzimas estão presentes em níveis muito altos no sangue e na urina. Por conseguinte, ocorre síntese das enzimas ativas; todavia, na ausência de glicosilação apropriada, elas são exportadas em vez de serem capturadas pelos lisossomos. *Em outras palavras, na doença de célula I, um conjunto completo de enzimas é incorretamente endereçado e distribuído para um local incorreto.* Normalmente, essas enzimas contêm um resíduo de manose 6-fosfato, um componente de *N*-oligossacarídio ligado a proteínas endereçado ao lisossomo. Entretanto, na doença da célula I, a manose ligada carece de um fosfato (Figura 11.27). A manose 6-fosfato é, de fato, o marcador que normalmente direciona muitas enzimas hidrolíticas do complexo de Golgi para os lisossomos. Os pacientes com doença da célula I apresentam deficiência da *N*-acetilglicosamina fosfotransferase, que catalisa a primeira etapa na adição do grupo fosforila; consequentemente, ocorre o direcionamento incorreto de oito enzimas essenciais. A doença da célula I faz com que o paciente desenvolva retardo psicomotor grave e deformidades esqueléticas, semelhantes àquelas observadas na doença de Hurler.

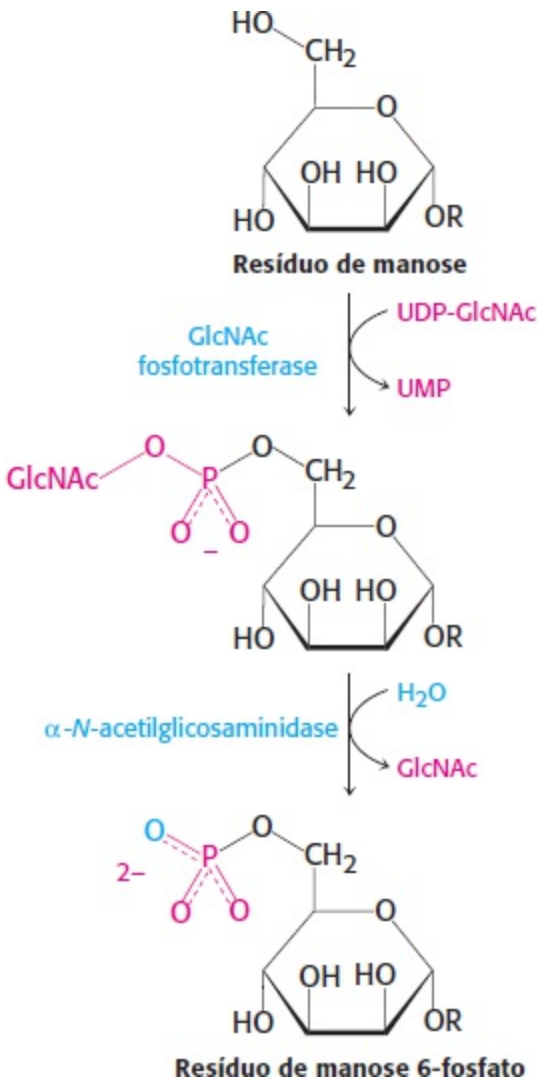


Figura 11.27 Formação de um marcador de manose 6-fosfato. Uma glicoproteína destinada a ser distribuída para os lisossomos adquire um marcador de fosfato no compartimento de Golgi, em um processo de duas etapas. Na primeira etapa, a GlcNAc fosfotransferase acrescenta uma unidade de fosfo-*N*-acetilglicosamina ao grupo 6-OH de uma manose; em seguida, uma *N*-acetilglicosaminidase remove o açúcar adicionado, gerando um resíduo de manose 6-fosfato no cerne

oligossacarídico.

Os oligossacarídios podem ser "sequenciados"

Como é possível determinar a estrutura de uma glicoproteína – as estruturas oligossacarídicas e seus pontos de união? A maioria dos procedimentos recorre às enzimas que clivam oligossacarídios em tipos específicos de ligações.

A primeira etapa consiste em desprender o oligossacarídio da proteína. Por exemplo, os oligossacarídios *N*-ligados podem ser liberados das proteínas por uma enzima, como a *peptídio N-glicosidase F*, que cliva as ligações *N*-glicosídicas que unem o oligossacarídio à proteína. Em seguida, os oligossacarídios podem ser isolados e analisados. MALDI-TOF ou outras técnicas de espectrometria de massa (Seção 3.4) fornecem a massa de um fragmento oligossacarídico. Entretanto, muitas estruturas oligossacarídicas possíveis são compatíveis com determinada massa. Podem-se obter informações mais completas pela clivagem do oligossacarídio com enzimas de especificidades variáveis. Por exemplo, a β-*1,4-galactosidase* cliva ligações β glicosídicas exclusivamente nos resíduos de galactose. Os produtos podem ser mais uma vez analisados por espectrometria de massa (Figura 11.28). A repetição desse processo com o uso de uma série de enzimas de diferentes especificidades revelará finalmente a estrutura do oligossacarídios.

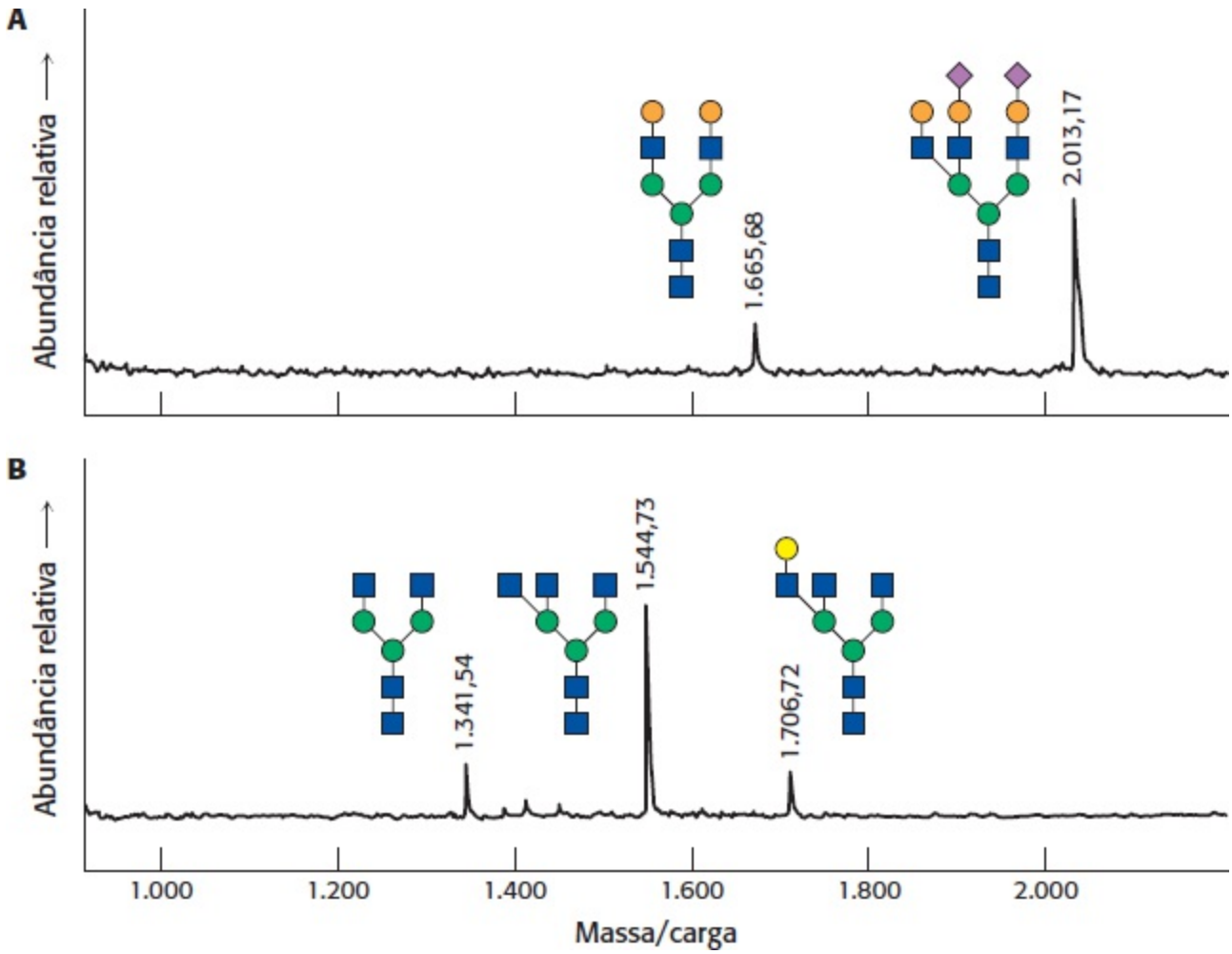


Figura 11.28 "Sequenciamento" de oligossacarídios por espectometria de massa. Foram usadas enzimas que clivam carboidratos para liberar e clivar especificamente o oligossacarídio componente da glicoproteína fetuína do soro bovino. As partes A e B mostram as massas obtidas por espectrometria MALDI-TOF, bem como as estruturas correspondentes dos produtos de digestão do oligossacarídio (utilizando o mesmo esquema que o da Figura 11.16): (**A**)

digestão com peptídio *N*-glicosidase F (para liberar o oligossacarídio da proteína) e neuraminidase (**B**) digestão com peptídio *N*-glicosidase F, neuraminidase e β-1,4-galactosidase. O conhecimento das especificidades das enzimas e da massa dos produtos possibilita a caracterização do oligossacarídio. Ver a chave dos carboidratos na Figura 11.16. [De A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, G. W. Hart, J. Marth (Eds.), Essentials of Glycobiology (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999), p. 596.]

Proteases aplicadas às glicoproteínas podem revelar os pontos de união dos oligossacarídios. A clivagem por uma protease específica produz um padrão característico de fragmentos peptídicos, que podem ser analisados por cromatografia. Os fragmentos ligados aos oligossacarídios podem ser distinguidos, visto que as suas propriedades cromatográficas variam com o tratamento com glicosidases. A análise por espectrometria de massa ou o sequenciamento direto dos peptídios podem revelar a identidade do peptídio em questão e, com esforços adicionais, o local exato de ligação ao oligossacarídio.

Observe que, agora que o sequenciamento do genoma humano está completo, a caracterização do proteoma muito mais complexo, incluindo as funções biológicas das proteínas especificamente modificadas, pode começar ativamente.

11.4 As lectinas são proteínas que ligam carboidratos específicos

A diversidade e a complexidade das unidades de carboidratos e as várias maneiras com que podem ser unidas em oligossacarídios e polissacarídios sugerem a sua importância funcional. A natureza não constrói padrões complexos quando padrões simples são suficientes. Por que, então, toda essa complexidade e diversidade? Hoje em dia, está claro que essas estruturas de carboidratos constituem os locais de reconhecimento para uma classe especial de proteína. Essas proteínas, denominadas *proteínas de ligação de glicanos*, ligam estruturas específicas de carboidratos em superfícies celulares adjacentes. Originalmente descobertas em plantas, as proteínas de ligação de glicana são ubíquas, e não foi encontrado nenhum organismo vivo que não tivesse essas proteínas essenciais. Concentremo-nos em uma classe particular de proteína de ligação de glicanos, denominada *lectina* (do latim *legere*, "selecionar"). A interação das lectinas com seus parceiros carboidratos é outro exemplo de carboidratos como moléculas ricas em informações que orientam numerosos processos biológicos. As estruturas diversas dos carboidratos apresentadas nas superfícies das células são bem apropriadas para atuarem como locais de interação entre as células e seus ambientes. É interessante observar que os parceiros ligantes de lectinas são frequentemente a fração carboidrato das lipoproteínas.

As lectinas promovem interações entre as células

O contato entre células é uma interação vital em numerosas funções bioquímicas, desde a formação de um tecido a partir de células isoladas até o processo de facilitação da transmissão de informações. A principal função das lectinas, que são proteínas que ligam carboidratos, consiste em facilitar o contato entre células. Em geral, uma lectina contém dois ou mais sítios de ligação para unidades de carboidratos. Esses sítios de ligação de carboidratos na superfície de uma célula interagem com um conjunto de carboidratos dispostos na superfície de outra célula. As lectinas e os carboidratos estão ligados por diversas interações não covalentes fracas, que asseguram

especificidade, mas que possibilitam a sua liberação, se necessário. As interações fracas entre uma superfície celular e outra assemelham-se à ação de um velcro; cada interação é fraca, porém o conjunto é forte.

Já encontramos uma lectina indiretamente. Lembre-se de que, na doença da célula I, as enzimas lisossômicas carecem da manose 6-fosfato apropriada, uma molécula que direciona as enzimas para os lisossomos. Em circunstâncias normais, o *receptor de manose 6-fosfato*, uma lectina, liga-se às enzimas no aparelho de Golgi e as direciona para o lisossomo.

As lectinas são organizadas em diferentes classes

As lectinas podem ser divididas em classes, com base nas sequências de seus aminoácidos e nas suas propriedades bioquímicas. Uma grande classe é constituída pelo tipo C (já que necessita da presença de *c*álcio) encontrado em animais. Cada uma dessas proteínas tem um domínio homólogo de 120 aminoácidos, que é responsável pela ligação ao carboidrato. A Figura 11.29 mostra a estrutura de um domínio desse tipo ligado a um carboidrato alvo.

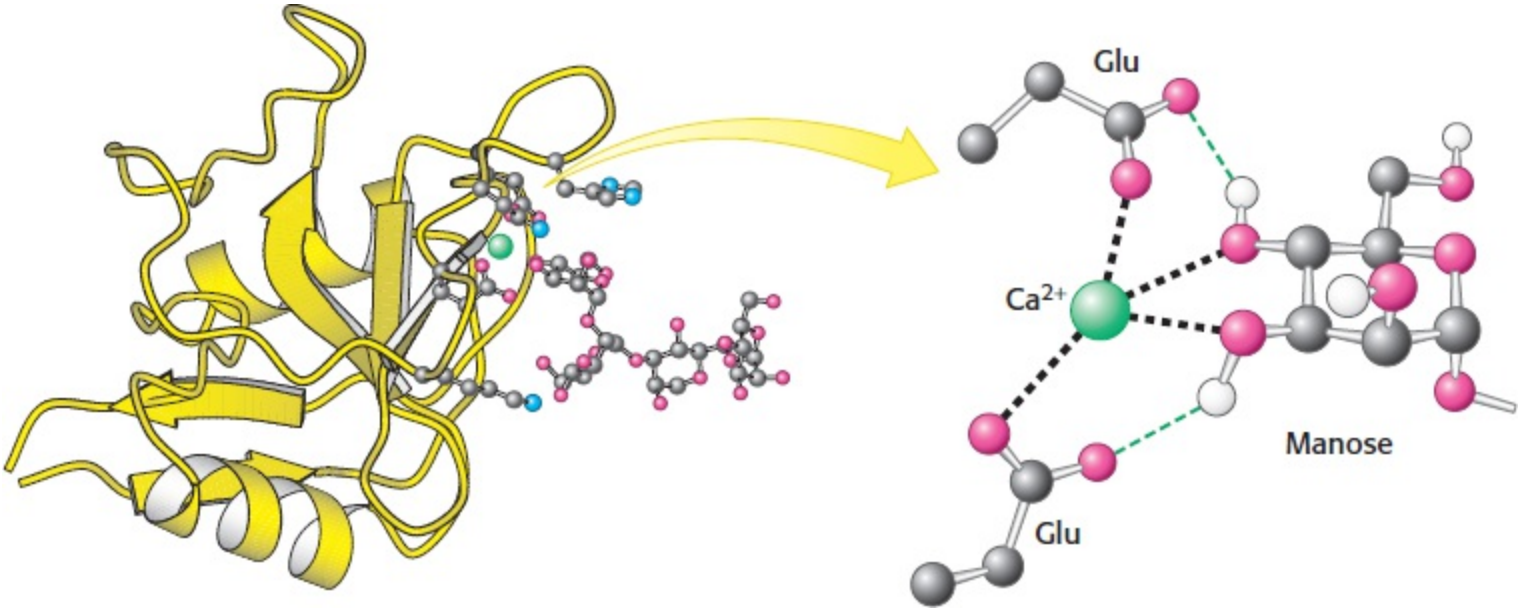


Figura 11.29 Estrutura de um domínio de ligação de carboidrato tipo C de uma lectina animal. *Observe* que um íon cálcio liga um resíduo de manose à lectina. São mostradas interações selecionadas, com omissão de alguns átomos de hidrogênio para maior clareza. [Desenhada a partir de 2MSC.pdb.]

Um íon cálcio na proteína atua como ponte entre a proteína e o açúcar por meio de interações diretas com grupos OH do açúcar. Além disso, dois resíduos de glutamato na proteína ligam-se ao íon cálcio e ao açúcar, enquanto outras cadeias laterais da proteína formam pontes de hidrogênio com outros grupos OH no carboidrato. A especificidade de ligação de determinada lectina a carboidratos é determinada pelos resíduos de aminoácidos que ligam o carboidrato.

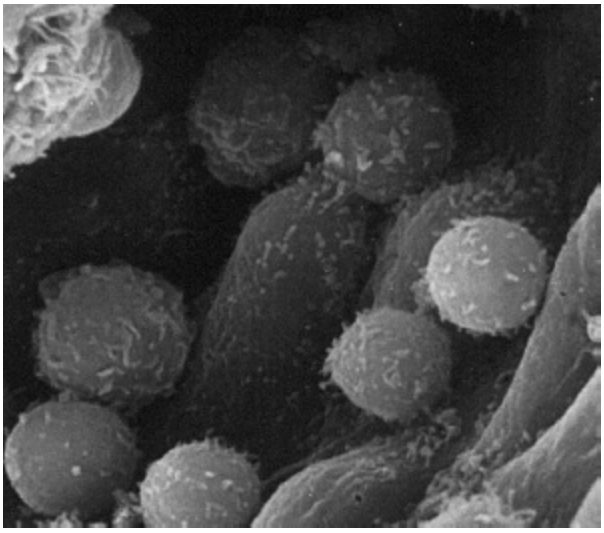


Figura 11.30 As selectinas medeiam interações entre células. A micrografia eletrônica de varredura mostra linfócitos aderindo-se ao revestimento endotelial de um linfonodo. As selectinas L na superfície do linfócito ligam-se especificamente a carboidratos no revestimento dos vasos dos linfonodos. [Cortesia do Dr. Eugene Butcher.]

Proteínas denominadas *selectinas* são membros da família do tipo C. As selectinas ligam células do sistema imune aos locais de lesão na resposta inflamatória (Figura 11.30). As formas L, E e P das selectinas ligam-se especificamente a carboidratos nos vasos dos *l*infonodos, *e*ndotélio ou *p*laquetas sanguíneas ativadas, respectivamente. Novos agentes terapêuticos para controlar a inflamação poderão surgir com o entendimento mais profundo da ligação das selectinas e de como elas distinguem diferentes carboidratos. A selectina L, que originalmente se acreditava que participasse apenas da resposta imune, é produzida pelos embriões quando estão prontos para se fixar ao endométrio do útero materno. Durante um curto período de tempo, as células endometriais apresentam um oligossacarídio na superfície celular. Quando o embrião se fixa através de lectinas, vias de sinalização no endométrio são ativadas possibilitando a implantação do embrião.

Outra grande classe de lectinas compreende as lectinas L. Essas lectinas são particularmente abundantes nas sementes de leguminosas, e muitas das caracterizações bioquímicas iniciais das lectinas foram efetuadas com essa lectina prontamente disponível. Embora o papel exato das lectinas nas plantas permaneça incerto, elas podem atuar como potentes inseticidas. Outras lectinas do tipo L, como a *calnexina* e a *calreticulina*, são chaperonas proeminentes no retículo endoplasmático eucariótico. Convém lembrar que as chaperonas são proteínas que facilitam o enovelamento de outras proteínas.

O vírus influenza liga-se a resíduos de ácido siálico

Muitos patógenos entram em células hospedeiras específicas por meio de sua adesão a carboidratos da superfície celular. Por exemplo, o vírus da *influenza* reconhece resíduos de ácidos siálico ligados a resíduos de galactose que estão presentes em glicoproteínas da superfície celular. A proteína viral que se liga a esses açúcares é denominada *hemaglutinina* (Figura 11.31.).

Após a ligação da hemaglutinina, o vírus é internalizado pela célula e começa a se replicar. Para sair da célula, os novos vírions precisam se ligar à hemaglutinina, em um processo que essencialmente é o inverso da entrada do vírus. Outra proteína viral, a neuraminidase (sialidase), cliva as ligações glicosídicas nos resíduos de ácido siálico da hemaglutinina, liberando o vírus para infectar novas células, com disseminação da infecção pelo trato respiratório. Os inibidores dessa

enzima, como o oseltamivir e o zanamivir, são importantes agentes antigripais.

A especificidade de ligação da hemaglutinina a carboidratos pode desempenhar um papel importante na especificidade de espécie da infecção e na facilidade de transmissão. Por exemplo, o vírus da *influenza* aviária H5N1 (*influenza* das aves) é particularmente letal e propaga-se rapidamente de uma ave para outra. Embora os seres humanos possam ser infectados por esses vírus, a infecção é rara, e a transmissão entre seres humanos é ainda mais rara. A base bioquímica dessas características reside no fato de que a hemaglutinina do vírus aviário reconhece uma sequência diferente de carboidrato daquela reconhecida na *influenza* humana. Embora os seres humanos tenham a sequência à qual se liga o vírus aviário, ela se localiza profundamente nos pulmões. Por conseguinte, a infecção pelo vírus aviário é difícil e, quando ocorre, o vírus não é prontamente transmitido pelo espirro ou pela tosse.

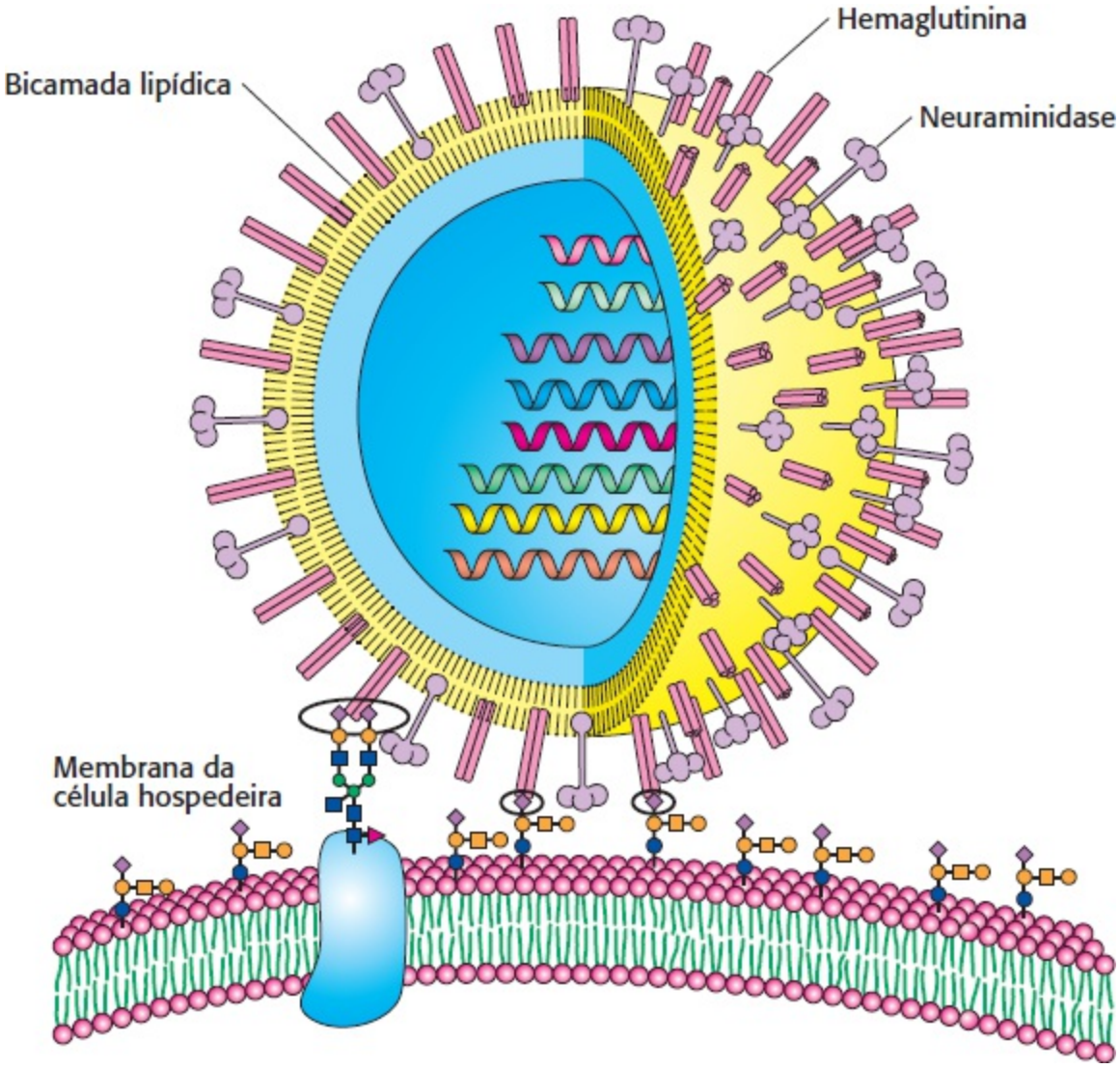


Figura 11.31 Receptores virais. O vírus da *influenza* atinge as células por meio de sua ligação a resíduos de ácido siálico (losangos de cor púrpura) localizados nas extremidades de oligossacarídios presentes nas glicoproteínas e glicolipídios de superfície celular. Esses carboidratos são ligados pela hemaglutinina (círculos de interação), uma das principais proteínas expressas na superfície do vírus. A outra proteína importante de superfície viral, a neuraminidase, é uma enzima que cliva cadeias de oligossacarídios, liberando a partícula viral em um estágio mais avançado do ciclo de vida do vírus.

O *Plasmodium falciparum*, o parasito protozoário que causa malária, também depende da ligação de glicana para infectar e colonizar o seu hospedeiro. As proteínas de ligação de glicana da forma parasitária inicialmente injetada pelo mosquito ligam-se ao sulfato de heparina do fígado, um

glicosaminoglicano que inicia a entrada do parasito na célula. Ao sair do fígado posteriormente no seu ciclo de vida, o parasito invade os eritrócitos utilizando outra proteína de ligação de glicana para ligar-se à fração de carboidrato de glicoforina, uma glicoproteína proeminente da membrana dos eritrócitos. O desenvolvimento de meios para interromper as interações de carboidrato entre patógenos e células do hospedeiro poderá ser clinicamente útil.

Resumo

11.1 Os monossacarídios são os carboidratos mais simples

Os carboidratos são aldoses ou cetoses ricas em grupos hidroxila. Uma aldose é um carboidrato com um grupo aldeído (como no gliceraldeído e na glicose), enquanto uma cetose contém um grupo ceto (como na di-hidroxiacetona e na frutose). Um açúcar pertence à série D se a configuração absoluta de seu átomo de carbono assimétrico mais distante do grupo aldeído ou ceto for a mesma que a do D-gliceraldeído. Os açúcares de ocorrência natural pertencem, em sua maioria, à série D. O aldeído do C-1 na forma de cadeia aberta da glicose reage com o grupo hidroxila do C-5, formando um anel hexagonal de piranose. O grupo ceto do C-2 na forma de cadeia aberta da frutose reage com um grupo hidroxila do C-5, formando um anel pentagonal de furanose. As pentoses, como a ribose e a desoxirribose, também formam anéis de furanose. Forma-se um centro assimétrico adicional no átomo de carbono anomérico (C-1 nas aldoses e C-2 nas cetoses) nessas ciclizações. O grupo hidroxila unido ao átomo de carbono anomérico está no lado oposto do anel em relação ao grupo CH_2OH unido ao centro quiral no anômero α, enquanto está do mesmo lado do anel que o grupo CH_2OH no anômero β. Nem todos os átomos do anel encontram-se no mesmo plano; na verdade, os anéis de piranose adotam habitualmente a conformação de cadeira, enquanto os anéis de furanose adotam, em geral, a conformação de envelope. Os açúcares são unidos a alcoóis e aminas por ligações glicosídicas a partir do átomo de carbono anomérico. Por exemplo, as ligações *N*-glicosídicas ligam açúcares às purinas e pirimidinas nos nucleotídios, RNA e DNA.

11.2 Os monossacarídios estão ligados entre si para formar carboidratos complexos

Os açúcares ligam-se uns aos outros por ligações *O*-glicosídicas, formando dissacarídios e polissacarídios. A sacarose, a lactose e a maltose são os dissacarídios mais comuns. A sacarose (açúcar comum de mesa) é constituída de α-glicose e β-frutose unidas por uma ligação glicosídica entre seus átomos de carbono anoméricos. A lactose (presente no leite) é constituída de galactose unida à glicose por uma ligação β-1,4. A maltose (do amido) é constituída de duas glicoses unidas por uma ligação α-1,4. O amido é uma forma polimérica de glicose nas plantas, e, nos animais, o glicogênio desempenha um papel semelhante. As unidades de glicose no amido e no glicogênio estão unidas, em sua maioria, por ligações α-1,4. A celulose, o principal polímero estrutural das paredes celulares das plantas, é constituída por unidades de glicose unidas por ligações β-1,4. Essas ligações β dão origem a longas cadeias lineares que formam fibrilas com alta resistência à tensão. Por outro lado, as ligações α no amido e no glicogênio resultam em hélices abertas, de acordo com suas funções como reservas mobilizáveis de energia.

11.3 Os carboidratos podem ligar-se às proteínas para formar glicoproteínas

Os carboidratos são comumente conjugados às proteínas. Se o componente proteico for predominante, o conjugado de proteína e carboidrato é denominado glicoproteína. As proteínas secretadas são, em sua maioria, glicoproteínas. A eritropoetina, uma molécula de sinalização, é uma glicoproteína. As glicoproteínas também são proeminentes na superfície externa da membrana plasmática. As proteínas que apresentam glicosaminoglicanos ligados covalentemente são denominadas proteoglicanos. Os glicosaminoglicanos são polímeros de dissacarídios repetidos. Uma das unidades em cada repetição é um derivado da glicosamina ou galactosamina. Esses carboidratos altamente aniônicos apresentam alta densidade de grupos carboxilado ou sulfato. Os proteoglicanos são encontrados na matriz extracelular dos animais e constituem componentes essenciais da cartilagem. As mucoproteínas, à semelhança dos proteoglicanos, consistem predominantemente em carboidratos por peso. O componente proteico é altamente *O*-glicosilado, com ligação do oligossacarídio à proteína pela *N*-acetilgalactosamina. As mucoproteínas atuam como lubrificantes.

Enzimas específicas ligam as unidades de oligossacarídios nas proteínas ao átomo de oxigênio da cadeia lateral de um resíduo de serina ou de treonina ou ao átomo de nitrogênio amídico da cadeia lateral de um resíduo de asparagina. A glicosilação da proteína ocorre no lúmen do retículo endoplasmático. Os oligossacarídios *N*-ligados são sintetizados sobre o dolicol fosfato e, subsequentemente, são transferidos para a proteína aceptora. Açúcares adicionais são unidos no complexo de Golgi para formar padrões diversos.

11.4 As lectinas são proteínas que ligam carboidratos específicos

Os carboidratos nas superfícies celulares são reconhecidos por proteínas denominadas lectinas. Nos animais, a interação das lectinas com seus açúcares-alvo orienta o contato entre células. A hemaglutinina, uma proteína viral, na superfície do vírus da *influenza,* reconhece resíduos de ácido siálico na superfície das células invadidas pelo vírus. Um pequeno número de resíduos de carboidrato pode unir-se de muitas maneiras diferentes, formando padrões altamente diversificados, que podem ser distinguidos pelos domínios de lectina dos receptores proteicos.

Palavras-chave

açúcar não redutor (p. 327)
açúcar redutor (p. 327)
aldose (p. 322)
amido (p. 330)
anômero (p. 325)
celulose (p. 330)
cetose (p. 322)
complexo de Golgi (p. 335)
diastereoisômero (p. 323)
dissacarídio (p. 329)
dolicol fosfato (p. 336)
enantiômero (p. 323)
epímero (p. 324)
estereoisômero (p. 323)

furanose (p. 325)
glicobiologia (p. 322)
glicoforma (p. 332)
glicogênio (p. 330)
glicômica (p. 322)
glicoproteína (p. 331)
glicosaminoglicano (p. 332)
glicosiltransferase (p. 337)
hemiacetal (p. 324)
hemicetal (p. 324)
heptose (p. 322)
hexose (p. 322)
isômero constitucional (p. 323)
lectina (p. 340)
ligação glicosídica (p. 328)
monossacarídio (p. 322)
mucina (mucoproteína) (p. 332)
oligossacarídio (p. 329)
pentose (p. 322)
piranose (p. 324)
polissacarídio (p. 330)
produtos finais de glicosilação avançada (AGE) (p. 328)
proteína de ligação de glicanos (p. 339)
proteoglicano (p. 332)
retículo endoplasmático (p. 335)
selectina (p. 341)
tetrose (p. 332)
triose (p. 332)

Questões

1. *Origem da palavra*. Explique a origem do termo *carboidrato*.

2. *Diversidade*. Quantos oligossacarídios diferentes podem ser formados pela ligação de uma glicose, uma manose e uma galactose? Suponha que cada açúcar esteja em sua forma de piranose. Compare esse número com o número de tripeptídios que podem ser formados a partir de três aminoácidos diferentes.

3. *Pares*. Indique se cada um dos seguintes pares de açúcares é constituído de anômeros, epímeros ou de um par aldose-cetose:

(a) D-gliceraldeído e di-hidroxiacetona

(b) D-glicose e D-manose

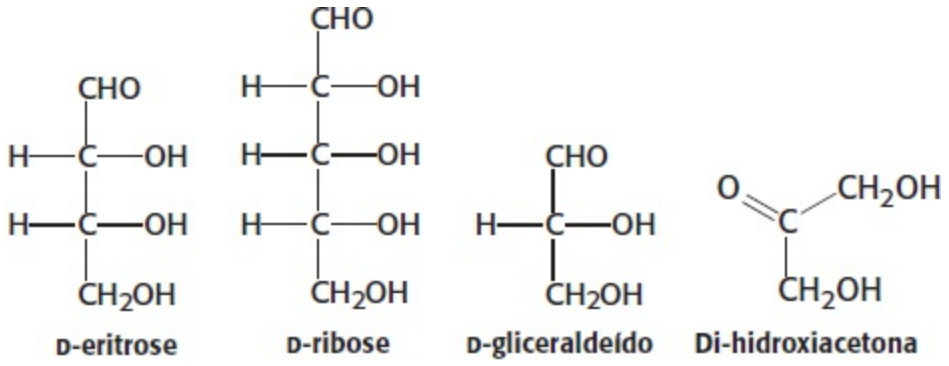
(c) D-glicose e D-frutose

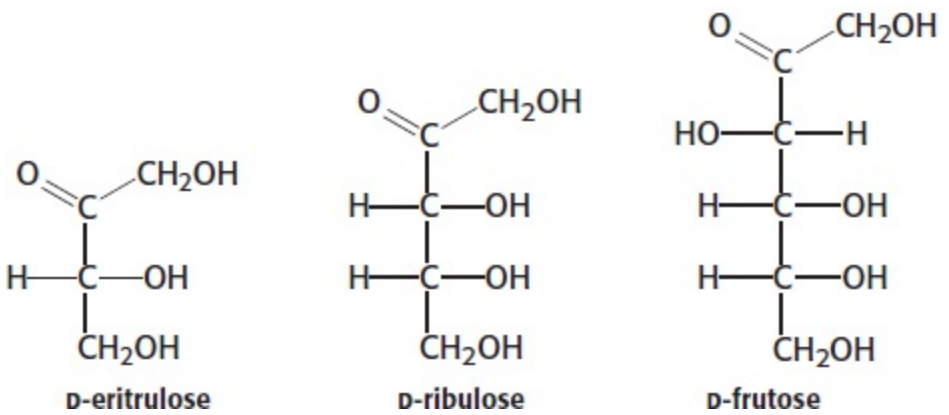
(d) α-D-glicose e β-D-glicose

(e) D-ribose e D-ribulose

(f) D-galactose e D-glicose

4. *Carbonos e carbonilas*. A que classes de açúcares pertencem os seguintes monossacarídios?





5. *Primos químicos*. Embora uma aldose com quatro átomos de carbono assimétricos seja capaz de formar 16 diastereoisômeros, apenas 8 dos isômeros são comumente observados, incluindo a glicose. São listados abaixo, com sua relação estrutural à glicose. Utilizando a estrutura da glicose como referencia, desenhe as seguintes estruturas.

D-alose: epimérica em C-3

D-altrose: isomérica em C-2 e C-3

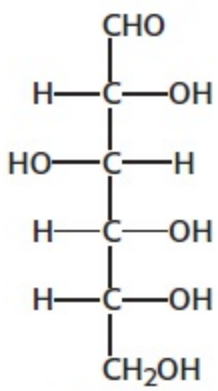
D-manose: epimérica em C-2

D-glicose: isomérica em C-3 e C-4

D-idose: isomérica em C-2, C-3 e C-4

D-galactose: epimérica em C-4

D-talose: isomérica em C-2 e C-4



6- *Mutarrotação*. As rotações específicas dos anômeros α e β da D-glicose são, respectivamente de + 112 e +18,7°. A rotação específica $[\alpha]_D$, é definida como a rotação observada da luz de comprimento de onda de 589 nm (a linha D de uma lâmpada de sódio) passando através de 10 cm de uma solução de 1 g ml^{-} de uma amostra. Quando uma amostra cristalina de α-D-glicopiranose é dissolvida em água, a rotação especifica diminui de 112° para um valor de equilíbrio de 52,7°. Com base nesse resultado, quais são as proporções dos anômeros de α e β em equilíbrio? Suponha que a concentração da forma de cadeia aberta seja desprezível.

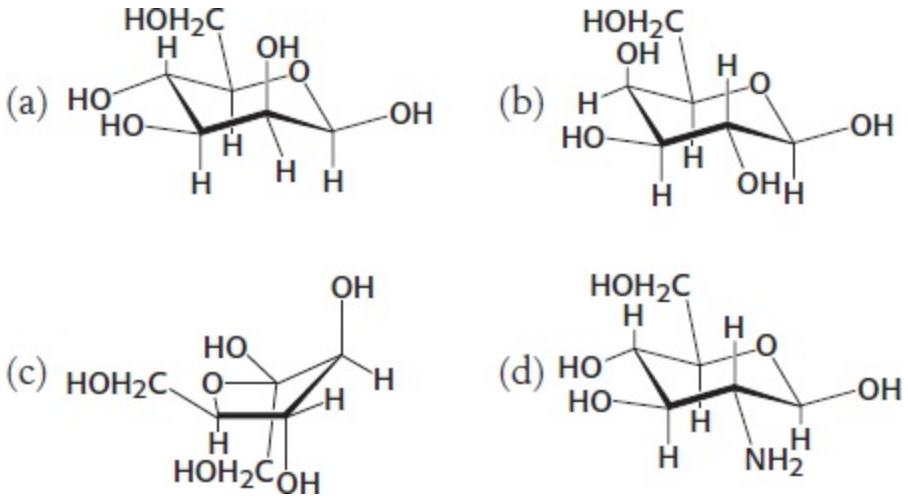
7. *Marcador informante*. A glicose reage lentamente com a hemoglobina e com outras proteínas,

formando compostos covalentes. Por que a glicose é reativa? Qual é a natureza do produto de adição formado?

8. Clivagem com periodato. Compostos contendo grupos hidroxila em átomos de carbono adjacentes sofrem clivagem da ligação carbono-carbono quando tratados com íons periodato (IO_4^-). Como essa reação pode ser utilizada para distinguir piranosídios de furanosídios?

9. *Fonte de oxigênio*. O átomo de oxigênio ligado ao C-1 no metil α-D-glicopiranosídio provém da glicose ou do metanol?

10. *Alinhamento de açúcares.* Identifique os quatro açúcares seguintes.



11. *Cola celular*. Foi postulado que uma unidade de trissacarídio de uma glicoproteína de superfície celular desempenha um papel crítico na mediação da adesão entre células em determinado tecido. Planeje um experimento simples para testar essa hipótese.

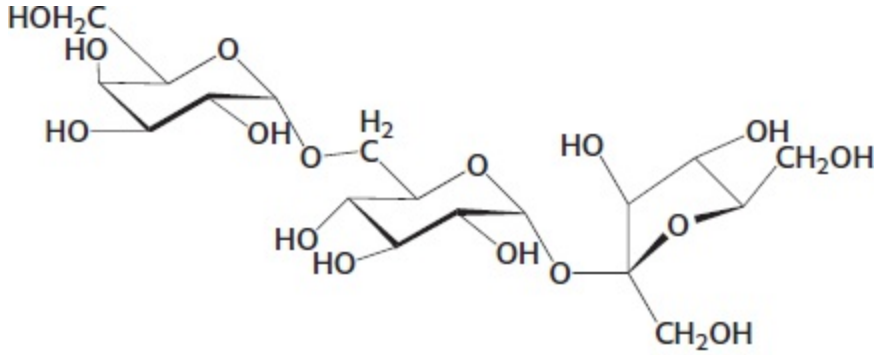
12. *Mapeando a molécula*. Cada um dos grupos hidroxila da glicose pode ser metilado com reagentes como o dimetil sulfato em condições alcalinas. Explique como a metilação exaustiva seguida da digestão completa de uma quantidade conhecida de glicogênio possibilitaria a determinação do número de pontos de ramificação e de extremidades redutoras.

13. *Partes componentes*. A rafinose é um trissacarídio e um constituinte de menor importância na beterraba.

(a) A rafinose é um açúcar redutor? Explique.

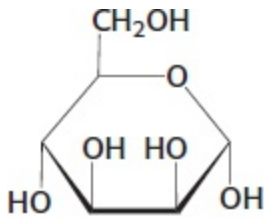
(b) Quais são os monossacarídios que compõem a rafinose?

(c) A β-galactosidase é uma enzima que removerá resíduos de galactose de um oligossacarídio. Quais são os produtos do tratamento da rafinose com β-galactosidase?



Rafinose

14. *Diferenças entre anômeros*. A α-D-manose é um açúcar de sabor doce. Por outro lado, a β-D-manose tem sabor amargo. Uma solução pura de α-D-manose perde o seu sabor doce com o passar do tempo, visto que é convertida no anômero β. Desenhe o anômero β e explique como ele se forma a partir do anômero α.



α-D-manose

15. *Sabor de mel.* A frutose em sua forma de β-D-piranose é responsável pelo forte sabor doce do mel. A forma β-D-furanose, apesar de ser doce, não é tão doce quanto a forma piranose. A forma furanose é a mais estável. Desenhe as duas formas e explique por que nem sempre é aconselhável cozinhar com mel.

16. *Fazendo os extremos se encontrarem.* (a) Compare o número de extremidades redutoras com as extremidades não redutoras em uma molécula de glicogênio. (b) Como veremos no Capítulo 21, o glicogênio é uma importante forma de armazenamento de energia, que é rapidamente mobilizada. Em qual extremidade – redutora ou não redutora – você espera que ocorra a maior parte do metabolismo?

17. *Uma propriedade perdida.* A glicose e a frutose são açúcares redutores. A sacarose, ou açúcar de mesa, é um dissacarídio constituído de frutose e glicose. A sacarose é um açúcar redutor? Explique.

18. *Carne e batatas.* Compare as estruturas do glicogênio e do amido.

19. *Reto ou curvo?* Explique as diferentes estruturas do glicogênio e da celulose?

20. *Proteínas doces*. Cite as principais classes de glicoproteínas, suas características e suas funções biológicas.

21. *Prolongamento da vida.* Qual é a função da fração carboidrato que está ligada à EPO?

22. *Amortecimento*. Qual é a função do glicosaminoglicano no amortecimento proporcionado pela cartilagem?

23. *Correspondência não entregue. Não devolvida ao remetente.* Ocorre doença da célula I quando

proteínas normalmente destinadas aos lisossomos carecem da molécula apropriada de endereçamento de carboidrato. Proponha outro modo possível do surgimento da doença da célula I.

24. *A partir de um, muitos*. O que se entende por glicoforma?

25. *Oma*. O que se entende por glicoma?

26. *Expansão exponencial?* Compare a quantidade de informações inerentes no genoma, no proteoma e no glicoma.

27. Fechaduras e chaves. O que o fato de que todos os organismos contêm lectinas sugere acerca do papel dos carboidratos?

28. *Carboidratos – não apenas para o desjejum.* Diferencie uma glicoproteína de uma lectina.

29. *Carboidratos e proteômica*. Suponha que uma proteína contenha 6 sítios potenciais de glicosilação *N*-ligados. Quantas proteínas possíveis podem ser geradas, dependendo de qual desses sítios é realmente glicosilado? Não inclua os efeitos da diversidade dentro do carboidrato adicionado.

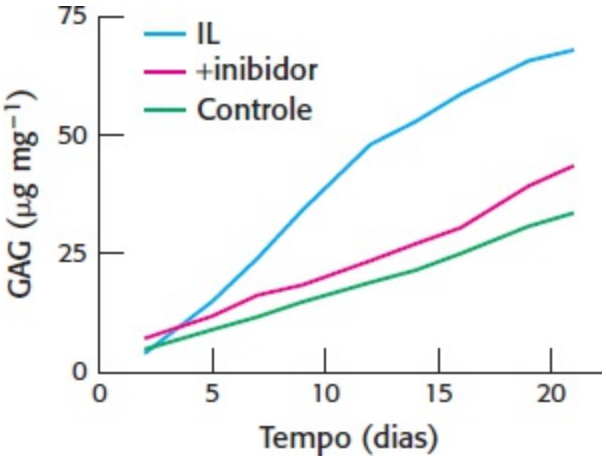
Questões | Integração de capítulos

30. *Estereoespecificidade*. A sacarose, um importante produto da fotossíntese nas folhas verdes, é sintetizada por uma bateria de enzimas. Os substratos para a síntese de sacarose, a D-glicose e a D-frutose, são uma mistura de anômeros α e β, bem como compostos acíclicos em solução. Todavia, a sacarose é constituída de α-D-glicose ligada pelo seu átomo de carbono 1 ao átomo de carbono 2da β-D-frutose. Como a especificidade da sacarose pode ser explicada à luz dos potenciais substratos?

31. *Reconhecimento específico*. Como a técnica de cromatografia de afinidade poderia ser usada para purificar as lectinas?

Questões | Interpretação de dados

32. *Articulações doloridas*. Um fator que contribui para o desenvolvimento da artrite é a destruição proteolítica inapropriada do componente agrecano da cartilagem pela enzima proteolítica agrecanase. A molécula de sinalização do sistema imune, a interleucina 2 (IL-2), ativa a agrecanase; com efeito, bloqueadores da IL-2 são algumas vezes utilizados no tratamento da artrite. Foram conduzidos estudos para determinar se inibidores da agrecanase podem contrabalançar os efeitos da IL-2. Fragmentos de cartilagem foram incubados em meios com várias adições, e a quantidade de destruição de agrecano foi medida em função do tempo.



[De M. A. Pratta et al. J. Biol. Chem. 278:45539-45545, 2003, Fig. 7B.]

(a) A degradação de agrecano foi medida pela liberação de glicosaminoglicano. Qual é a base racional desse ensaio?

(b) Por que a liberação de glicosaminoglicano poderia não indicar uma degradação de agrecano?

(c) Qual é o propósito do controle – cartilagem incubada sem nenhuma adição?

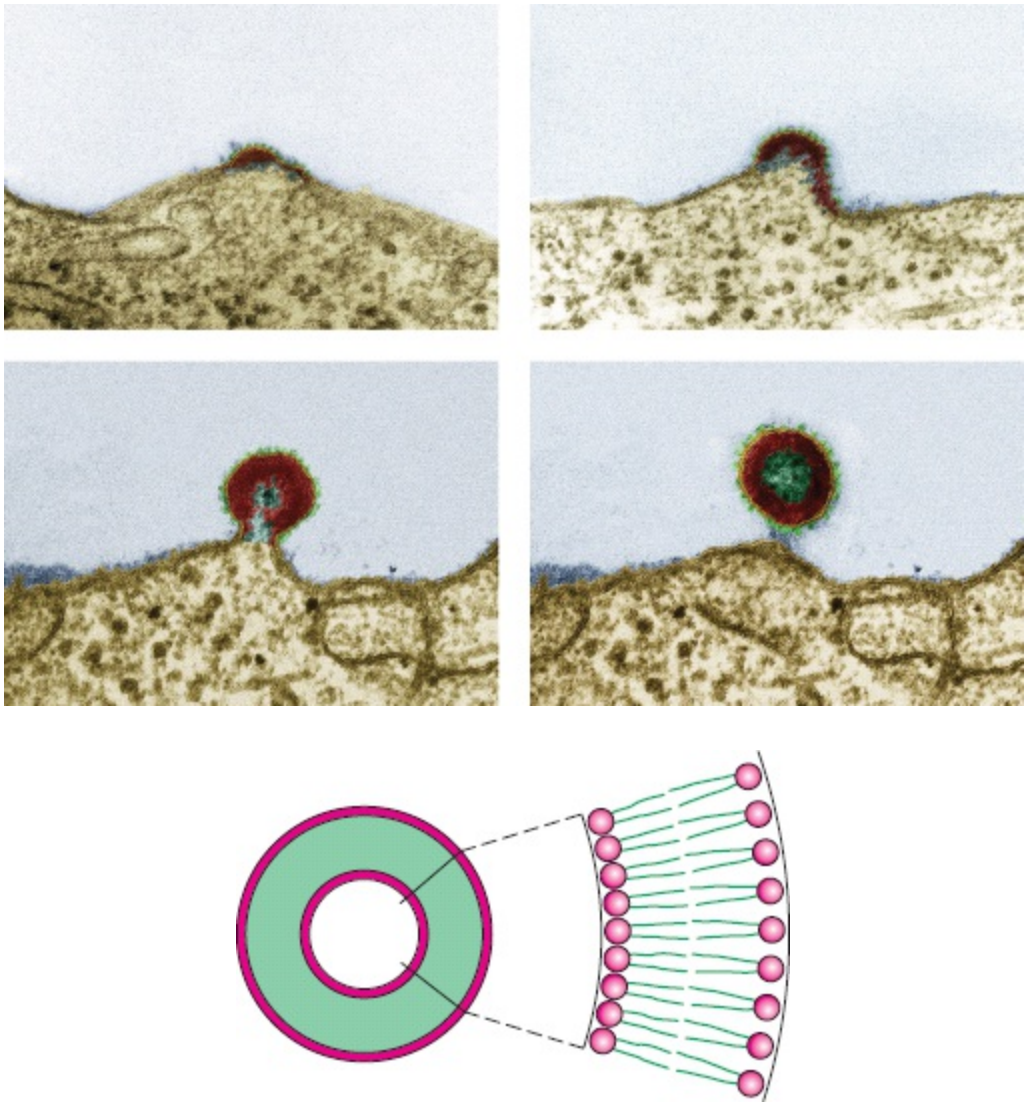
(d) Qual o efeito da adição de IL-2 ao sistema?

(e) Qual é a resposta quando se adiciona um inibidor da agrecanase (ST154) além da IL-2?

(f) Por que ocorre alguma destruição de agrecano no controle com o passar do tempo?

Lipídios e Membranas Celulares

12



Uma partícula do HIV sai de uma célula infectada por brotamento da membrana. As membranas celulares são estruturas altamente dinâmicas, que sofrem automontagem espontaneamente. Direcionadas por interações hidrofóbicas, conforme ilustrado no diagrama à direita, as caudas dos ácidos graxos dos lipídios da membrana se aglomeram (verde), enquanto as cabeças polares (vermelho) permanecem expostas nas superfícies [micrografias de Eye of Science/Photo Researchers.]

SUMÁRIO

12.1 Os ácidos graxos são constituintes essenciais dos lipídios

12.2 Existem três tipos comuns de lipídios de membrana

12.3 Os fosfolipídios e os glicolipídios formam prontamente lâminas bimoleculares em meios aquosos

12.4 As proteínas realizam a maior parte dos processos da membrana

12.5 Os lipídios e muitas proteínas de membrana difundem-se rapidamente no plano da membrana

12.6 As células eucarióticas contêm compartimentos delimitados por membranas internas

Os limites de todas as células são estabelecidos por *membranas biológicas* (Figura 12.1). Essas barreiras impedem que as moléculas produzidas dentro da célula escapem e também impedem que as moléculas indesejadas do lado de fora se difundam para dentro; contudo, elas também contêm sistemas de transporte que possibilitam à célula captar moléculas específicas e remover as indesejadas. Esses sistemas de transporte conferem às membranas a sua importante propriedade de *permeabilidade seletiva.*

As membranas são estruturas dinâmicas, nas quais as proteínas flutuam em um mar de lipídios. Os componentes lipídicos da membrana formam a barreira de permeabilidade, enquanto os componentes proteicos atuam como sistema de transporte de bombas e canais, que possibilitam a entrada e a saída da célula de moléculas selecionadas. Esse sistema de transporte será considerado no próximo capítulo.

Além de uma membrana celular externa (denominada *membrana plasmática*), as células eucarióticas também contêm membranas internas que definem os limites das organelas, como mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomos e lisossomos. A especialização funcional no decurso da evolução tem sido estreitamente ligada à formação desses compartimentos. Sistemas específicos foram desenvolvidos durante a evolução para possibilitar o endereçamento de proteínas selecionadas para ou através de determinadas membranas internas e, portanto, para organelas específicas. As membranas externas e internas compartilham propriedades essenciais, que constituem o tema deste capítulo.

As membranas biológicas desempenham várias outras funções indispensáveis à vida, como o armazenamento de energia e a transdução de informações, que são comandadas pelas proteínas associadas a elas. Neste capítulo, examinaremos as propriedades das proteínas de membrana que as possibilitam existir no ambiente hidrofóbico da membrana enquanto conectam dois ambientes hidrofílicos, porém as funções dessas proteínas serão descritas em capítulos posteriores.

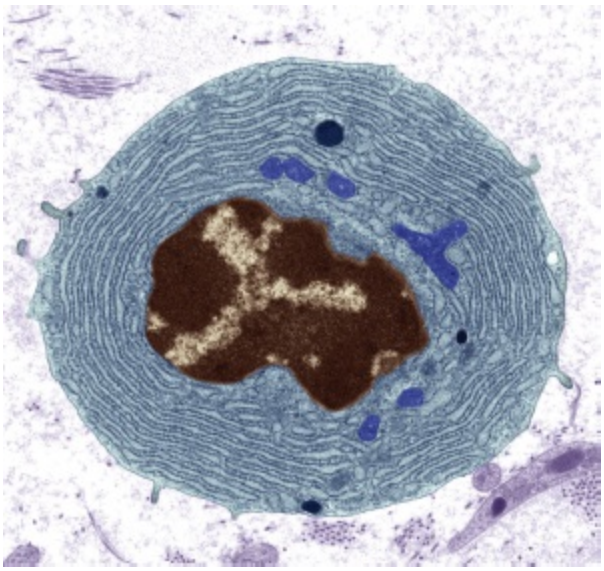


Figura 12.1 Micrografia eletrônica de um plasmócito. Essa micrografia foi colorida para indicar o limite distinto da célula constituído pela membrana plasmática. [Steve Gschmeissner/Photo Researchers.]

Muitas características comuns estão subjacentes à diversidade das membranas biológicas

As membranas são tão diversas na sua estrutura quanto na sua função. Entretanto, elas apresentam em comum diversos atributos importantes:

1. As membranas são *estruturas laminares*, com apenas duas moléculas de espessura, que estabelecem *limites fechados* entre diferentes compartimentos. A espessura da maioria das membranas varia de 60 Å (6 nm) a 100 Å (10 nm).

2. As membranas são constituídas principalmente de *lipídios* e *proteínas*. A razão de massa entre lipídios e proteínas varia de 1:4 a 4:1. As membranas também contêm carboidratos, que estão ligados aos lipídios e às proteínas.

3. Os lipídios de membranas são pequenas moléculas que apresentam unidades tanto *hidrofílicas* quanto *hidrofóbicas*. Esses lipídios formam espontaneamente lâminas bimoleculares fechadas em meios aquosos. Essas bicamadas lipídicas atuam como barreiras ao fluxo de moléculas polares.

4. *Proteínas específicas medeiam funções distintas das membranas*. As proteínas atuam como bombas, canais, receptores, transdutores de energia e enzimas. As proteínas de membrana estão inseridas em bicamadas lipídicas, que criam ambientes apropriados para a sua ação.

5. As membranas são *montagens não covalentes*. As moléculas de proteínas e lipídios que constituem as membranas são mantidas juntas por numerosas interações não covalentes, que atuam de modo cooperativo.

6. As membranas são *assimétricas*. As duas faces das membranas biológicas sempre diferem uma da outra.

7. As membranas são *estruturas fluidas*. As moléculas de lipídios difundem-se rapidamente no plano da membrana, assim como as proteínas, a não ser que estejam ancoradas por interações específicas. Em contrapartida, as moléculas de lipídios e as proteínas não rotacionam prontamente através da membrana. As membranas podem ser consideradas *soluções bidimensionais de proteínas e lipídios orientados*.

8. As membranas celulares são, em sua maioria, *eletricamente polarizadas,* com o lado interno negativo [tipicamente –60 minivolts (mV)]. O potencial de membrana desempenha um papel essencial no transporte, na conversão de energia e na excitabilidade (Capítulo 13).

12.1 Os ácidos graxos são constituintes essenciais dos lipídios

As propriedades hidrofóbicas dos lipídios são essenciais para a sua capacidade de formar membranas e, na maioria das vezes, devem-se a um componente: os ácidos graxos.

Os nomes dos ácidos graxos baseiam-se em seus hidrocarbonetos originais

Os ácidos graxos consistem em longas cadeias hidrocarbonadas, com vários comprimentos e graus de insaturação, que terminam em grupos de ácido carboxílico. O nome sistemático de um ácido graxo deriva do nome de seu hidrocarboneto original pela substituição do *o* final por *oico*. Por exemplo, o ácido graxo saturado C_{18} é denominado ácido octadecanoico, porque o hidrocarboneto original é o

octadecano. Um ácido graxo C_{18} com uma ligação dupla é denominado ácido octadec*enoico*; com duas ligações duplas, ácido octadeca*dienoico*; e, por fim, com três ligações duplas, ácido octadeca*trienoico*. A notação 18:0 denota um ácido graxo C_{18} sem dupla ligação, enquanto 18:2 significa que existem duas ligações duplas. As estruturas das formas ionizadas de dois ácidos graxos comuns – o ácido palmítico (16:0) e o ácido oleico (18:1) – são apresentadas na Figura 12.2.

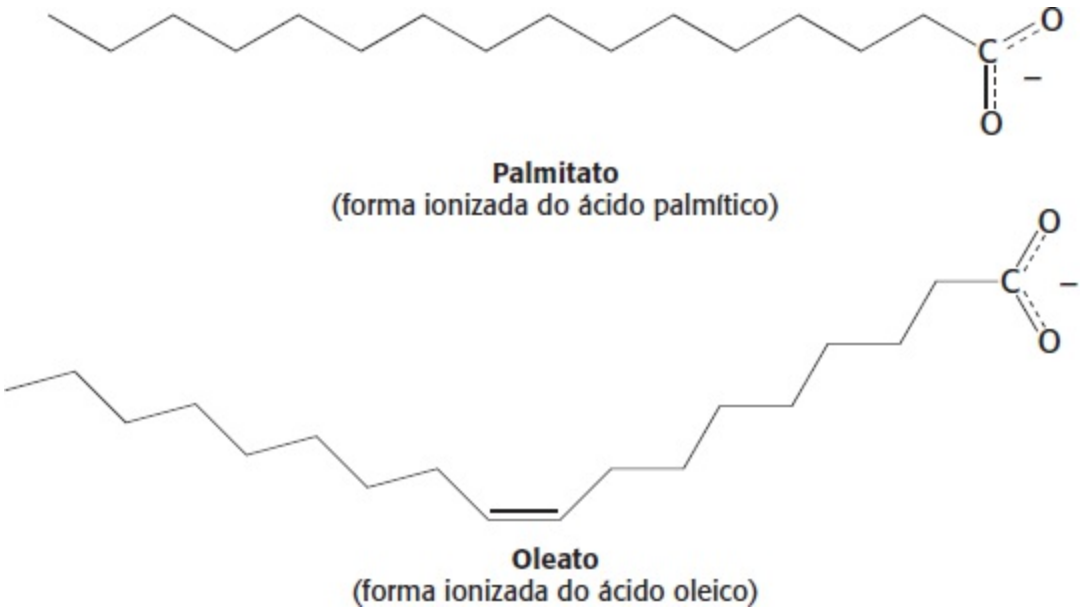
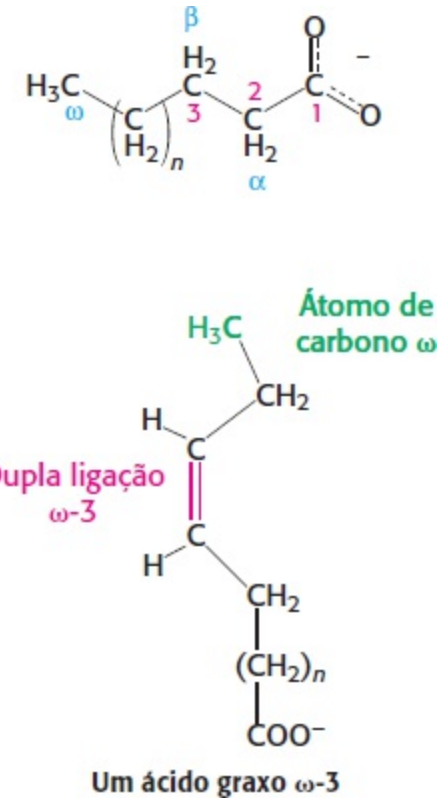


Figura 12.2 Estruturas de dois ácidos graxos. O palmitato é um ácido graxo saturado de 16 carbonos, enquanto o oleato é um ácido graxo de 18 carbonos com somente uma dupla ligação.



Os átomos de carbono dos ácidos graxos são numerados a partir da extremidade carboxiterminal, conforme ilustrado na margem. Os átomos de carbono 2 e 3 são frequentemente designados como α e β, respectivamente. O átomo de carbono metila na extremidade distal da cadeia é denominado *átomo de carbono* ω. A posição de uma dupla ligação é representada pelo símbolo Δ, seguido de um

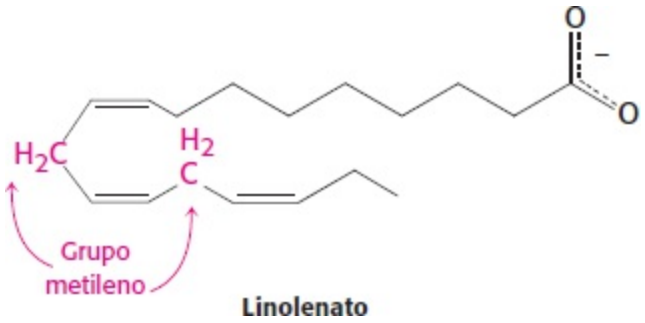
número sobrescrito. Por exemplo, *cis*-Δ^9 significa que existe uma dupla ligação cis entre os átomos de carbono 9 e 10; *trans*-Δ^2 significa a presença de uma dupla ligação trans entre os carbonos 2 e 3. Como alternativa, a posição de uma dupla ligação pode ser indicada contando a partir da extremidade distal, com o átomo de carbono ω (o carbono metílico) como número 1. Por exemplo, um ácido graxo ω tem a estrutura ilustrada na margem. Os ácidos graxos ionizam-se em pH fisiológico, de modo que é apropriado referir-se a eles de acordo com a sua forma carboxilado: por exemplo, palmitato ou hexadecanoato.

Tabela 12.1 Alguns ácidos graxos de ocorrência natural em animais.

Número de carbonos	Número de duplas ligações	Nome comum	Nome sistemático	Fórmula
12	0	Laurato	*n*-Dodecanoato	$CH_3(CH_2)_{10}COO^-$
14	0	Miristato	*n*-Tetradecanoato	$CH_3(CH_2)_{12}COO^-$
16	0	Palmitato	*n*-Hexadecanoato	$CH_3(CH_2)_{14}COO^-$
18	0	Estearato	*n*-Octadecanoato	$CH_3(CH_2)_{16}COO^-$
20	0	Araquidato	*n*-Eicosanoato	$CH_3(CH_2)_{18}COO^-$
22	0	Beenato	*n*-Docosanoato	$CH_3(CH_2)_{20}COO^-$
24	0	Lignocerato	*n*-Tetracosanoato	$CH_3(CH_2)_{22}COO^-$
16	1	Palmitoleato	*cis*-Δ^9-hexadecenoato	$CH_3(CH_2)_5CH{=}{=}CH(CH_2)_7COO^-$
18	1	Oleato	*cis*-Δ^9-octadecenoato	$CH_3(CH_2)_7CH{=}{=}CH(CH_2)_7COO^-$
18	2	Linoleato	*cis, cis*-Δ^9, Δ^{12} - octadecadienoato	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}{=}CHCH_2)_2CH_6{-}COO^-$
18	3	Linolenato	*all-cis*-Δ^9, Δ^{12}, Δ^{15}-octadecatrienoato	$CH_3CH_2(CH{=}{=}CHCH_2)_3(CH_2)_6COO^-$
20	4	Araquidonato	*all-cis*-Δ^5, Δ^8,Δ^{11}, Δ^{14}-eicosatetraenoato	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}{=}CHCH_2)_4(CH_2)_2COO^-$

Os ácidos graxos variam quanto a seu comprimento de cadeia e grau de insaturação

Os ácidos graxos nos sistemas biológicos contém habitualmente um número par de átomos de carbono, tipicamente entre 14 e 24 (Tabela 12.1). Os ácidos graxos com 16 e 18 carbonos são os mais comuns. O predomínio de cadeias de ácidos graxos contendo um número par de átomos de carbono está de acordo com o modo pelo qual ocorre a sua biossíntese (Capítulo 26). A cadeia hidrocarbonada geralmente não é ramificada nos ácidos graxos de animais. A cadeia alquila pode ser saturada, ou pode conter uma ou mais duplas ligações. A configuração dessas duplas ligações é cis na maioria dos ácidos graxos insaturados. As duplas ligações nos ácidos graxos poli-insaturados são separadas por pelo menos um grupo metileno.



Linolenato

As propriedades dos ácidos graxos e dos lipídios derivados deles dependem acentuadamente do comprimento da cadeia e do grau de saturação. Os ácidos graxos insaturados apresentam pontos de fusão mais baixos do que os ácidos graxos saturados com o mesmo comprimento. Por exemplo, o ponto de fusão do ácido esteárico é de 69,6°C, enquanto o do ácido oleico (que contém uma dupla ligação cis) é de 13,4°C. Os pontos de fusão dos ácidos graxos polissaturados da série C_{18} são ainda mais baixos. O comprimento da cadeia também afeta o ponto de fusão, o que é ilustrado pela temperatura de fusão do ácido palmítico (C_{16}), de 6,5° abaixo daquela do ácido esteárico (C_{18}). Por conseguinte, *as cadeias curtas e a insaturação aumentam a fluidez dos ácidos graxos e de seus derivados.*

12.2 Existem três tipos comuns de lipídios de membrana

Por definição, os *lipídios são biomoléculas insolúveis em água, mas altamente solúveis em solventes orgânicos, como o clorofórmio.* Os lipídios desempenham uma variedade de funções biológicas: servem como substratos energéticos, como altas reservas de energia, como moléculas sinalizadoras e mensageiros em vias de transdução de sinais e como componentes das membranas. As primeiras três funções dos lipídios serão discutidas em capítulos posteriores. Nosso foco agora são os lipídios como constituintes de membranas. Os três tipos principais de lipídios de membranas são os *fosfolipídios*, os *glicolipídios* e o *colesterol*. Começaremos com os lipídios encontrados nos eucariotos e nas bactérias. Os lipídios da *archaea* são distintos, embora exibam muitas características em comum com os de outros organismos no que concerne à formação das membranas.

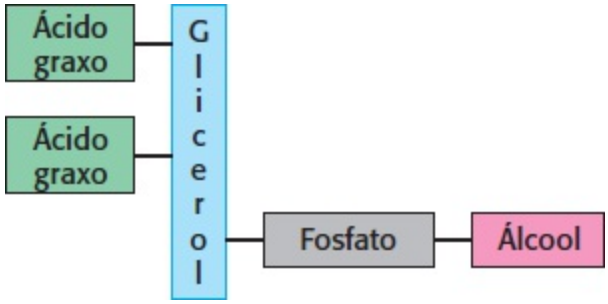


Figura 12.3 Estrutura esquemática de um fosfolipídio.

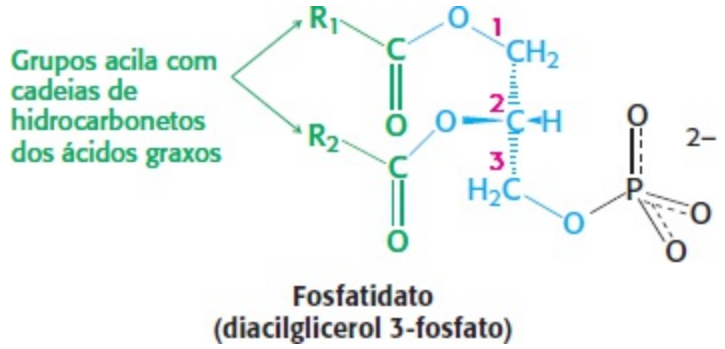


Figura 12.4 Estrutura do fosfatidato (diacilglicerol 3-fosfato). A figura mostra a configuração absoluta do carbono central (C-2).

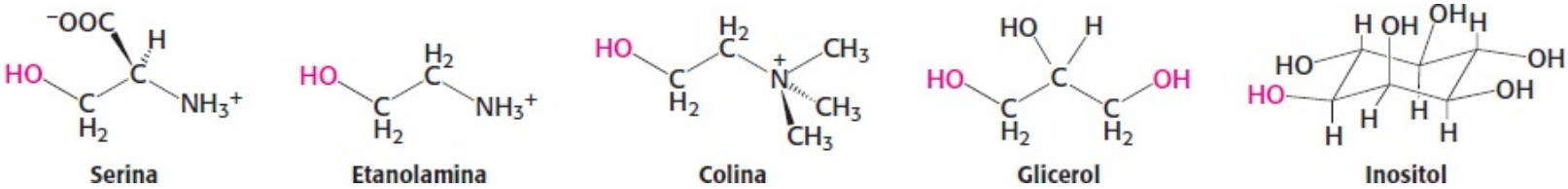
Os fosfolipídios constituem a principal classe de lipídios de membrana

Os *fosfolipídios* são abundantes em todas as membranas biológicas. Uma molécula de fosfolipídio é constituída de quatro componentes: um ou mais ácidos graxos, uma plataforma à qual se fixam os ácidos graxos, um fosfato e um álcool ligado ao fosfato (Figura 12.3). Os ácidos graxos componentes fornecem uma barreira hidrofóbica, enquanto o restante da molécula tem propriedades hidrofílicas que possibilitam a interação com o meio aquoso.

A plataforma sobre a qual os fosfolipídios são formados pode ser o *glicerol*, um álcool de três carbonos, ou a *esfingosina*, um álcool mais complexo. Os fosfolipídios derivados do glicerol são denominados *fosfoglicerídios*. Um fosfoglicerídio é constituído de um arcabouço de glicerol ao qual estão fixadas duas cadeias de ácidos graxos e um álcool fosforilado.

Nos fosfoglicerídios, os grupos hidroxila em C-1 e C-2 do glicerol são esterificados aos grupos carboxila das duas cadeias de ácidos graxos. O grupo hidroxila no C-3 do arcabouço de glicerol é esterificado com ácido fosfórico. Quando não ocorre mais nenhuma adição, o composto resultante é um *fosfatidato* (*diacilglicerol 3-fosfato*), que é o fosfoglicerídio mais simples. Existem apenas pequenas quantidades de fosfatidato nas membranas. Entretanto, a molécula é um intermediário essencial na biossíntese dos outros fosfoglicerídios (Seção 26.1). A configuração absoluta do componente glicerol 3-fosfato dos lipídios de membrana é mostrada na Figura 12.4.

Os principais fosfoglicerídios derivam do fosfatidato pela formação de uma ligação éster entre o grupo fosfato do fosfatidato e o grupo hidroxila de um dos vários alcoóis. Componentes comuns dos alcoóis dos fosfoglicerídios são o aminoácido serina, a etalonamina, a colina, o glicerol e o inositol.



As fórmulas estruturais da fosfatidilcolina e dos outros fosfoglicerídios principais – isto é, a fosfatidiletanolamina, a fosfatidilserina, o fosfatidilinositol e o difosfatidilglicerol – são apresentadas na Figura 12.5.

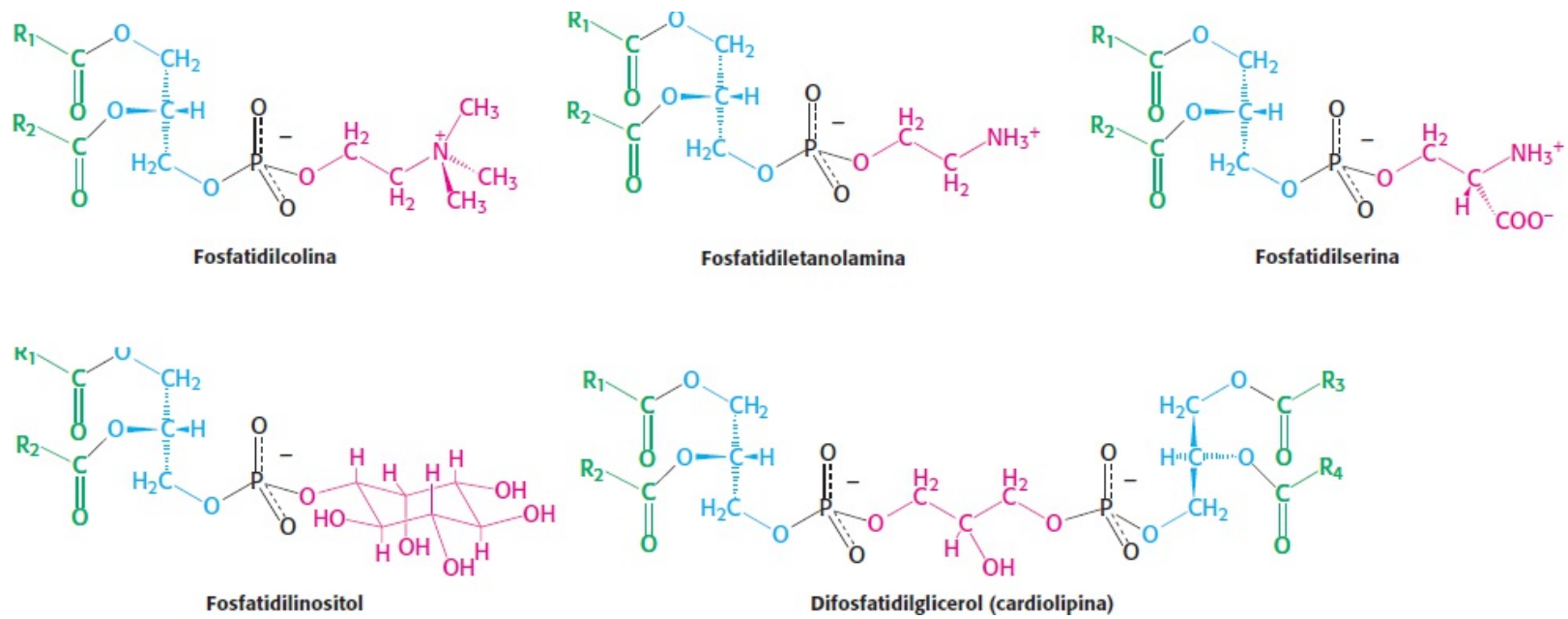


Figura 12.5 Alguns fosfoglicerídios comuns encontrados nas membranas.

A *esfingomielina* é um fosfolipídio encontrado nas membranas, que não é derivado do glicerol. Na verdade, o arcabouço na esfingomielina é a *esfingosina*, um aminoálcool que contém uma longa cadeia hidrocarbonada insaturada (Figura 12.6). Na esfingomielina, o grupo amino do arcabouço de esfingosina está ligado a um ácido graxo por uma ligação amídica. Além disso, o grupo hidroxila primário da esfingosina é esterificado com fosforil colina.

Os lipídios de membrana podem incluir frações de carboidratos

A segunda classe importante de lipídios de membrana, os glicolipídios, são os lipídios que contêm açúcares. À semelhança da esfingomielina, os glicolipídios nas células animais são derivados da esfingosina. O grupo amino do arcabouço da esfingosina é acilado por um ácido graxo, na esfingomielina. Os glicolipídios diferem da esfingomielina na identidade da unidade que está ligada ao grupo hidroxila primário da esfingosina. Nos glicolipídios, um ou mais açúcares (em lugar da fosforil colina) estão ligados a esse grupo. O glicolipídio mais simples, denominado *cerebrosídio*, contém um único resíduo de açúcar, a glicose ou a galactose.

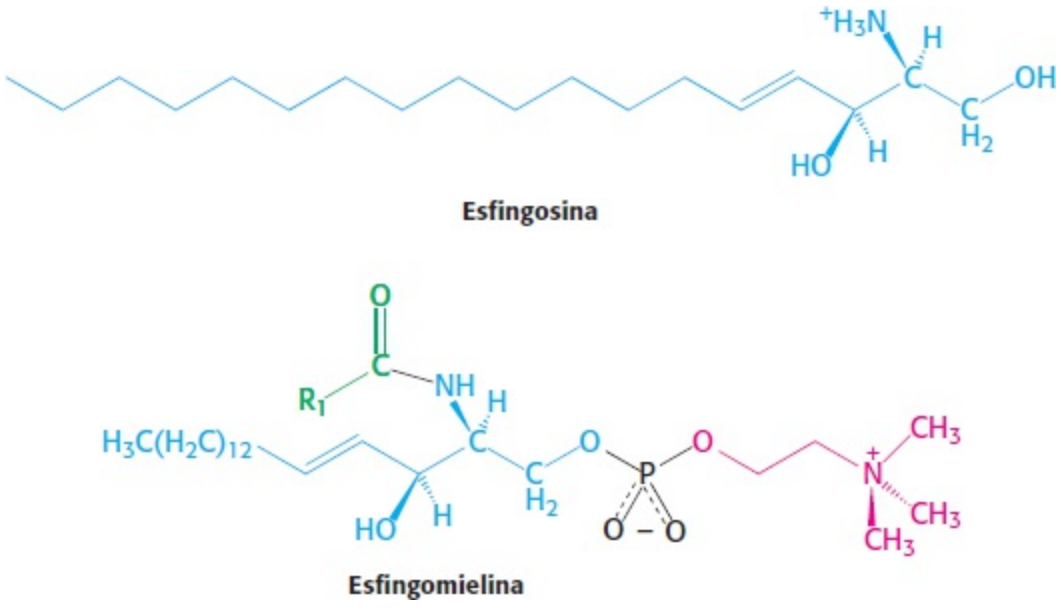
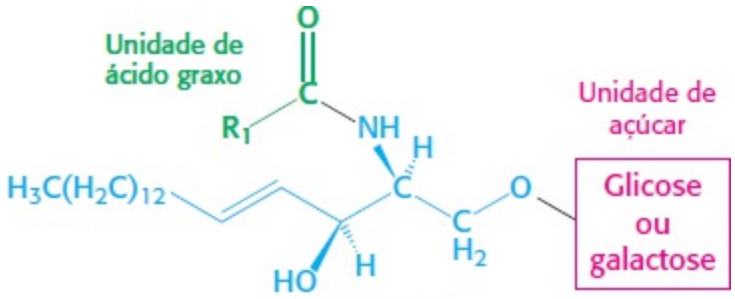


Figura 12.6 Estruturas da esfingosina e esfingomielina. A metade esfingosina da esfingomielina está realçada em azul.



Os glicolipídios mais complexos, como os *gangliosídios*, contêm uma cadeia ramificada de até sete resíduos de açúcar. Os glicolipídios são orientados de modo totalmente assimétrico, com os *resíduos de açúcar sempre no lado extracelular da membrana.*

O colesterol é um lipídio com base em um núcleo esteroide

O *colesterol*, o terceiro tipo principal de lipídio de membrana, tem uma estrutura bem diferente daquela dos fosfolipídios. Trata-se de um esteroide, formado a partir de quatro anéis hidrocarbonados ligados.

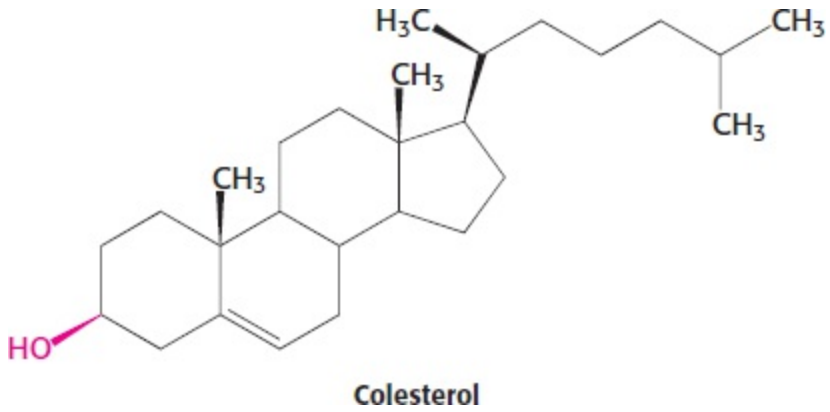
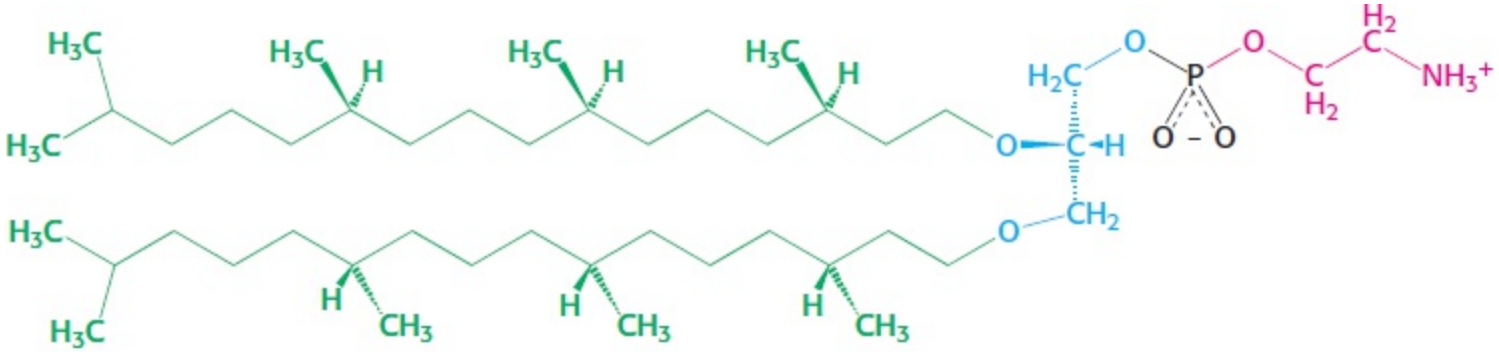


Figura 12.7 Um *archae* e seu ambiente. Os *archaea* podem desenvolver-se em *habitats* tão inóspitos quanto uma abertura de vulcão. Aqui, os *archaea* formam um tapete laranja, circundado por depósitos sulfurosos amarelos. [Krafft-Explorer/Photo Researchers.]

Uma cauda de hidrocarboneto está ligada ao esteroide em uma extremidade, e um grupo hidroxila está ligado à outra. Nas membranas, a orientação da molécula é paralela às cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídios, e o grupo hidroxila interage com as cabeças dos fosfolipídios próximas. O colesterol está ausente nos procariotos, porém é encontrado em graus variáveis em praticamente todas as membranas animais. Constitui cerca de 25% dos lipídios de membrana em certas células nervosas, porém, essencialmente, não é observado em algumas membranas intracelulares.

As membranas de *archaea* são formadas a partir de lipídios de ligação éter com cadeias ramificadas

As membranas de *archaea* diferem, na sua composição, daquelas dos eucariotos ou das bactérias em três aspectos importantes. Duas dessas diferenças estão claramente relacionadas com as condições hostis de muitas espécies de *archaea* (Figura 12.7). Em primeiro lugar, as cadeias apolares são unidas a um arcabouço de glicerol por ligações éter em lugar de éster. A ligação éter é mais resistente à hidrólise. Em segundo lugar, as cadeias alquila são ramificadas, e não lineares. São constituídas de repetições de um fragmento de cinco carbonos totalmente saturado. Esses hidrocarbonetos ramificados e saturados são mais resistentes à oxidação. A capacidade dos lipídios de *archaea* de resistir à hidrolise e à oxidação pode ajudar esses organismos a suportar as condições extremas nas quais alguns desses *archaea* crescem, como altas temperaturas, pH baixo ou alta concentração salina. Por fim, a estereoquímica do glicerol central é invertida em comparação com aquela mostrada na Figura 12.4.



Lipídio de membrana do archae *Methanococcus jannaschii*

Um lipídio de membrana é uma molécula anfipática que contém um componente hidrofílico e outro hidrofóbico

O repertório de lipídios de membrana é extenso. Todavia, esses lipídios apresentam um tema estrutural crítico comum: *os lipídios de membrana são moléculas anfipáticas* (moléculas anfifílicas). Um lipídio de membrana contém tanto um componente *hidrofílico* quanto um *hidrofóbico*.

Examinemos um modelo de um fosfoglicerídio, como a fosfatidilcolina. Sua forma global é quase retangular (Figura 12.8A). As duas cadeias hidrofóbicas de ácidos graxos são quase paralelas uma a outra, enquanto o componente hidrofílico da fosforilcolina aponta para o sentido oposto. A esfingomielina tem uma conformação semelhante, assim como o lipídio de *archaea* ilustrado. Por conseguinte, foi adotada a seguinte representação simplificada para representar esses lipídios de membrana: a unidade hidrofílica, também denominada *cabeça polar*, é representada por um circulo, enquanto as caudas hidrocarbonadas são representadas por linhas retas ou onduladas (Figura 12.8B).

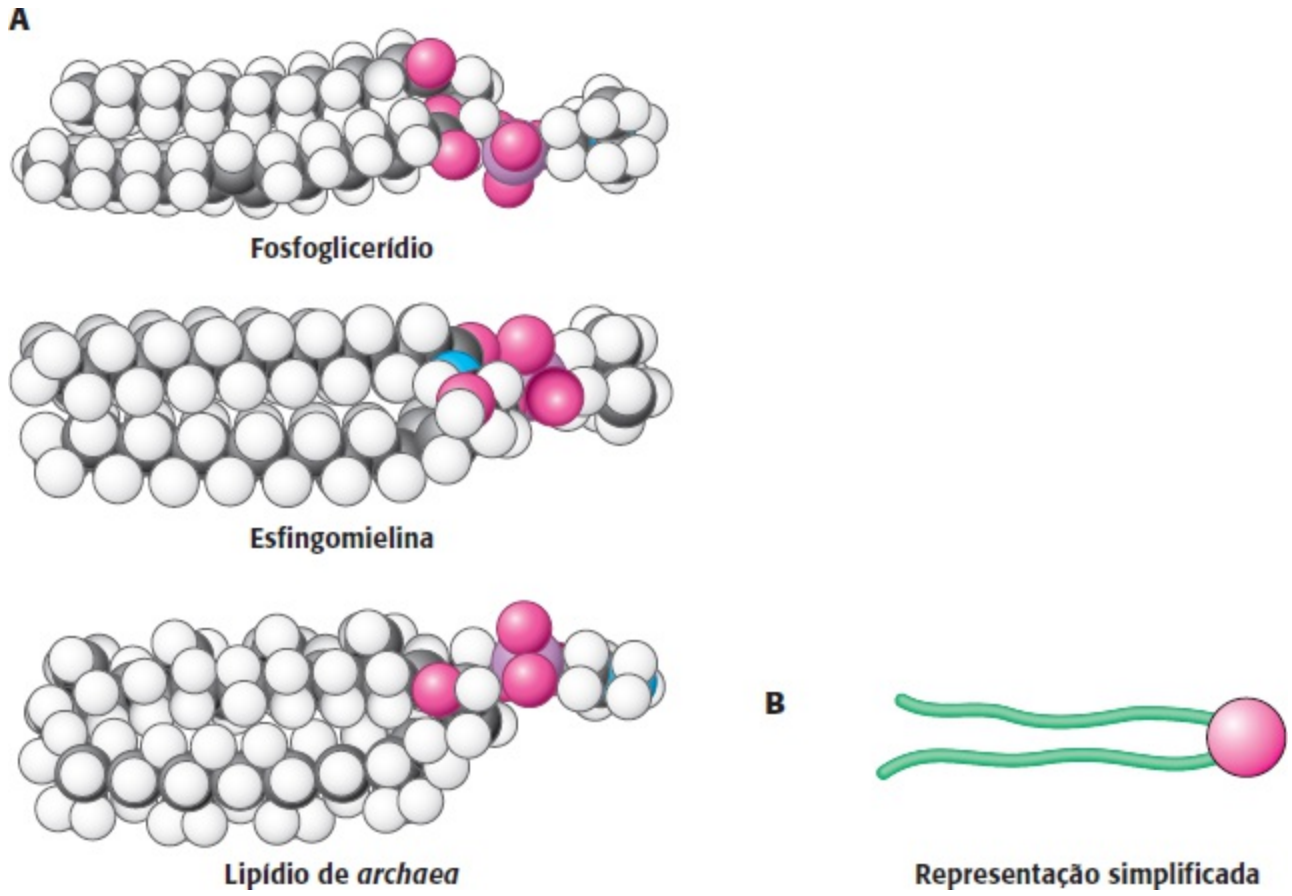


Figura 12.8 Representações dos lipídios de membrana. A. Modelos de preenchimento espacial de um fosfoglicerídio, da

esfingomielina e de um lipídio de *archaea*, mostrando suas formas e a distribuição dos componentes hidrofílico e hidrofóbico. **B.** Representação simplificada de um lipídio de membrana.

12.3 Os fosfolipídios e os glicolipídios formam prontamente lâminas bimoleculares em meios aquosos

Quais são as propriedades que capacitam os fosfolipídios a formar membranas? *A formação de membranas é uma consequência da natureza anfipática das moléculas.* Suas cabeças polares favorecem o contato com a água, enquanto suas caudas hidrocarbonadas interagem preferencialmente umas com as outras, e não com a água. Como moléculas com essas preferências podem dispor-se em soluções aquosas? Uma maneira é formar uma estrutura globular, denominada *micela*. As cabeças polares formam a superfície externa da micela, que é circundada por água, enquanto as caudas hidrocarbonadas são sequestradas no interior, interagindo umas com as outras (Figura 12.9).

Alternativamente, as preferências fortemente opostas dos componentes hidrofílicos e hidrofóbicos dos lipídios de membranas podem ser satisfeitos com a formação de uma *bicamada lipídica*, composta de duas lâminas de lipídios (Figura 12.10). Uma bicamada lipídica também é denominada *lâmina bimolecular*. As caudas hidrofóbicas de cada lâmina individual interagem umas com as outras, formando um interior hidrofóbico que atua como barreira de permeabilidade. As cabeças hidrofílicas interagem com o meio aquoso em cada lado da bicamada. As duas lâminas opostas são denominadas folhetos.

A estrutura favorecida para a maioria dos lipídios e glicolipídios em meios aquosos é uma lâmina bimolecular, em lugar de uma micela. O motivo disso é que as duas cadeias de ácidos graxos de um fosfolipídio ou glicolipídio são demasiado volumosas para se encaixar no interior de uma micela. Por outro lado, os sais de ácidos graxos (como o palmitato de sódio, um constituinte do sabão) formam prontamente micelas, visto que contêm apenas uma cadeia. *A formação de bicamadas em lugar de micelas de fosfolipídios é de grande importância biológica*. Uma micela é uma estrutura limitada, habitualmente com menos de 200 Å (20 nm) de diâmetro. Por outro lado, uma lâmina bimolecular pode se estender até alcançar dimensões macroscópicas, como um milímetro (10^7 Å, ou 10^6 nm) ou mais. Os fosfolipídios e moléculas relacionadas são constituintes importantes de membranas, visto que eles formam prontamente extensas lâminas bimoleculares (Figura 12.11).

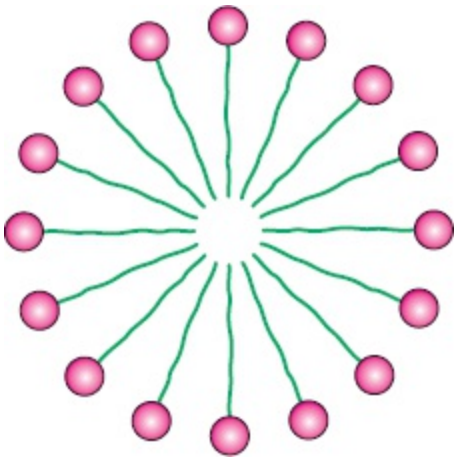


Figura 12.9 Diagrama de um corte de uma micela. Os ácidos graxos ionizados formam prontamente essas estruturas, mas não a maioria dos fosfolipídios.

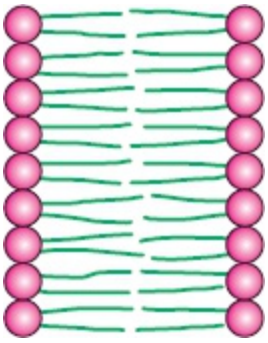


Figura 12.10 Diagrama de um corte de uma membrana de dupla camada (bicamada).

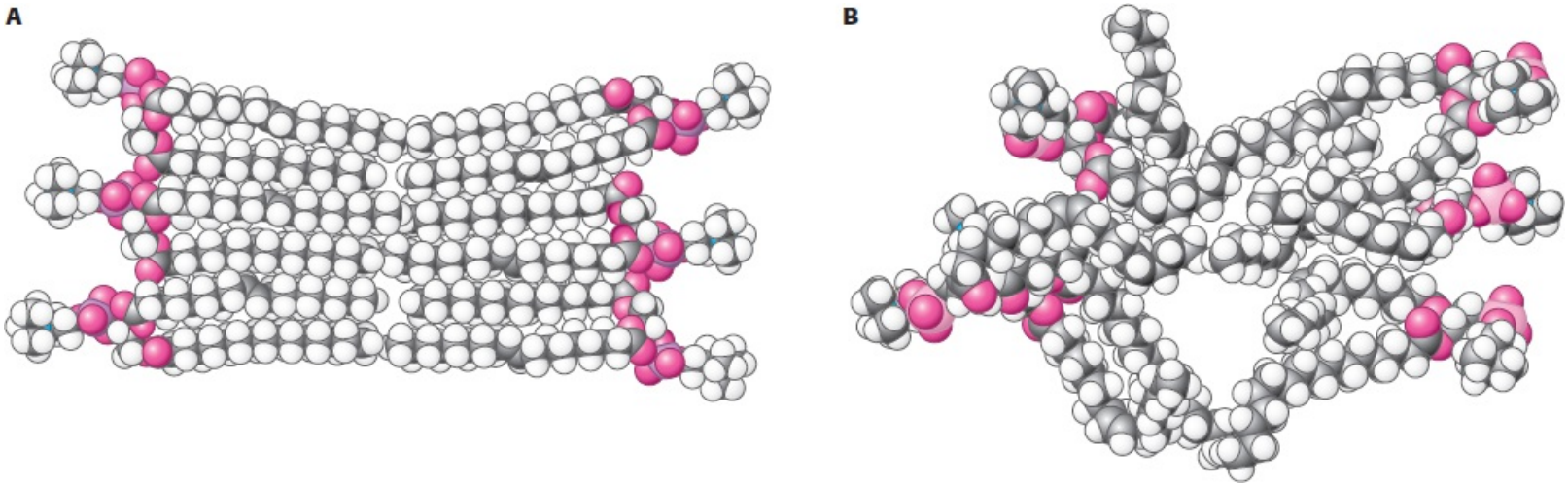


Figura 12.11 Modelo de preenchimento espacial de um corte de uma membrana de dupla camada fosfolipídica. A. Uma vista idealizada, mostrando estruturas regulares. **B.** Uma vista mais realista de uma bicamada fluida, mostrando estruturas mais irregulares das cadeias de ácidos graxos.

As bicamadas lipídicas formam-se espontaneamente por *um processo de automontagem*. Em outras palavras, a estrutura de lâmina bimolecular é inerente à estrutura das moléculas lipídicas constituintes. O crescimento de bicamadas lipídicas a partir de fosfolipídios é rápido e espontâneo na água. *As interações hidrofóbicas constituem a principal força motriz para a formação de bicamadas lipídicas*. Convém lembrar que as interações hidrofóbicas também desempenham um papel predominante no empilhamento das bases dos ácidos nucleicos e no enovelamento das proteínas (Seções 1.3 e 2.4). Moléculas de água são liberadas das caudas hidrocarbonadas dos lipídios de membrana quando elas são sequestradas no interior apolar da bicamada. Além disso, *as forças atrativas de van der Waals entre as caudas hidrocarbonadas favorecem o acondicionamento estreito das caudas*. Por fim, existem atrações eletrostáticas e pontes de hidrogênio entre as cabeças polares e as moléculas de água. Assim, as bicamadas lipídicas são estabilizadas por todo o conjunto das forças que medeiam as interações moleculares nos sistemas biológicos. Como as bicamadas lipídicas são mantidas unidas por numerosas *interações não covalentes de reforço* (*predominantemente hidrofóbicas*), elas são *estruturas cooperativas*. Essas interações hidrofóbicas têm três consequências biológicas significativas (1) as bicamadas lipídicas têm uma tendência inerente a serem *extensas*; (2) as bicamadas lipídicas tendem a se *fechar sobre elas próprias* para que não haja bordas com cadeias hidrocarbonadas expostas, com consequente formação de compartimentos; e (3) as bicamadas lipídicas são *autosselantes*, visto que qualquer orifício em uma bicamada é energeticamente desfavorável.

Vesículas lipídicas podem ser formadas a partir de fosfolipídios

A propensão dos fosfolipídios a formar membranas foi utilizada para criar uma importante ferramenta experimental e clínica. As *vesículas lipídicas* ou *lipossomos* são compartimentos aquosos delimitados por uma bicamada lipídica (Figura 12.12). Essas estruturas podem ser empregadas no estudo da permeabilidade das membranas ou para fornecer substâncias químicas às células. Os lipossomos são formados pela suspensão de um lipídio adequado, como a fosfatidilcolina, em um meio aquoso, e, em seguida, por *sonicação* (*i.e.*, agitação por ondas sonoras de alta frequência), produzindo uma dispersão de vesículas fechadas com tamanho muito uniforme. As vesículas formadas por esse método são quase esféricas e têm cerca de 500 Å (50 nm) de diâmetro. Vesículas maiores (da ordem de 1 μm ou 10^4 Å de diâmetro) podem ser preparadas por evaporação lenta do solvente orgânico de uma suspensão de fosfolipídio de um sistema de solventes mistos.

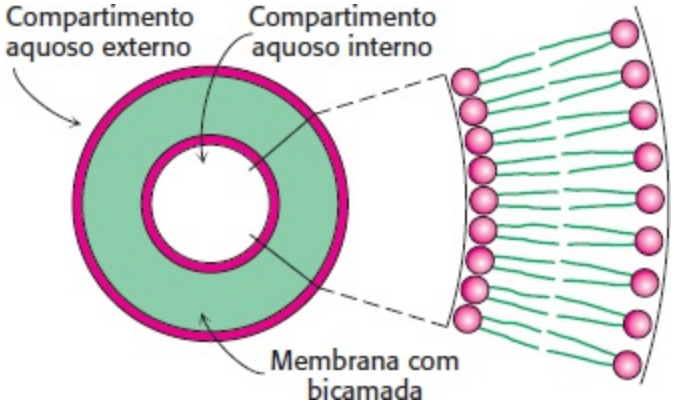


Figura 12.12 Lipossomo. Um lipossomo ou vesícula lipídica é um pequeno compartimento aquoso circundado por uma bicamada lipídica.

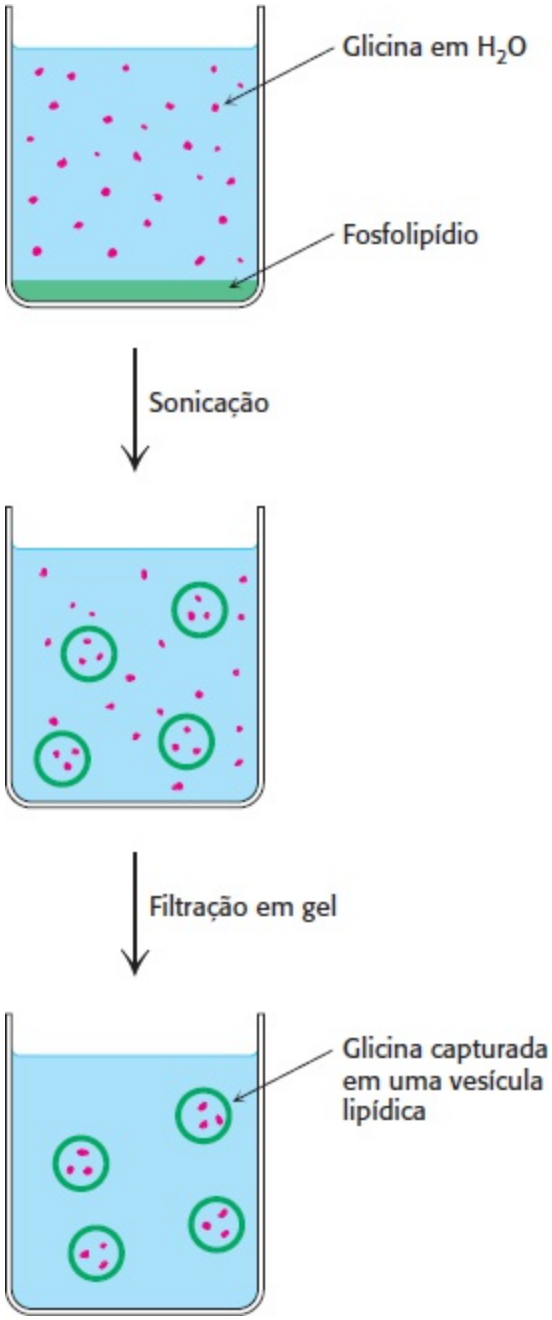


Figura 12.13 Preparação de lipossomos contendo glicina. Lipossomos contendo glicina são formados por sonicação de fosfolipídios na presença de glicina. A glicina livre é removida por filtração em gel.

Os íons ou moléculas podem ser capturados nos compartimentos aquosos das vesículas lipídicas pela formação de vesículas na presença dessas substâncias (Figura 12.13). Por exemplo, vesículas com diâmetros de 500 Å formadas em uma solução de glicina 0,1 M irão capturar cerca de 2.000 moléculas de glicina em cada compartimento aquoso interno. Essas vesículas contendo glicina podem ser separadas da solução de glicina circundante por diálise ou por cromatografia de filtração em gel. A permeabilidade da membrana de bicamada à glicina pode ser então determinada pela medição da velocidade de efluxo da glicina do compartimento interno da vesícula para a solução ambiente. Os lipossomos podem ser formados com proteínas específicas de membranas inseridas neles ao solubilizar as proteínas na presença de detergentes e, em seguida, ao adicioná-las aos fosfolipídios a partir dos quais os lipossomos serão formados. Os complexos de proteína-lipossomo fornecem instrumentos experimentais valiosos para a análise de uma variedade de funções das proteínas de membranas.

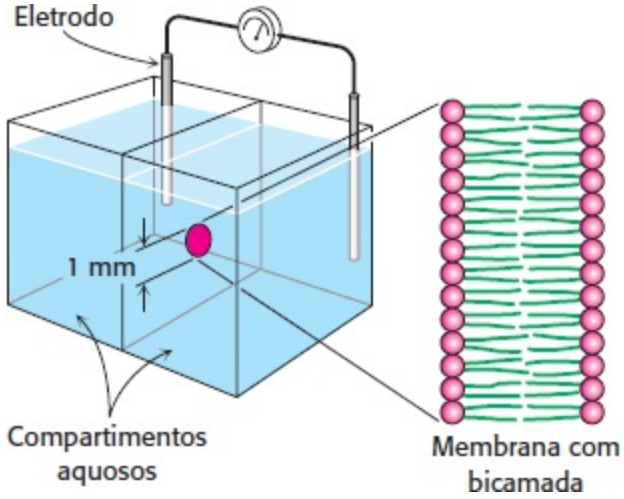


Figura 12.14 Montagem experimental para o estudo de uma membrana com bicamada planar. Uma membrana de bicamada é formada através de um orifício de 1 mm em um septo que separa dois compartimentos aquosos. Esse arranjo possibilita a medição da permeabilidade e da condutância elétrica das bicamadas lipídicas.

As aplicações terapêuticas dos lipossomos estão atualmente em fase ativa de investigação. Por exemplo, lipossomos contendo fármacos ou DNA para experimentos de terapia gênica podem ser injetados em pacientes. Esses lipossomos fundem-se com a membrana plasmática de muitos tipos de células, introduzindo nelas as moléculas que contêm. A administração de fármacos através de lipossomos frequentemente diminui a sua toxicidade. Uma quantidade menor do fármaco é distribuída para os tecidos normais, visto que os lipossomos de circulação prolongada concentram-se em regiões de circulação sanguínea aumentada, como tumores sólidos e locais de inflamação. Além disso, a fusão seletiva das vesículas lipídicas com determinados tipos de células constitui uma forma promissora de controlar o direcionamento de fármacos para as células-alvo.

Outra membrana sintética bem definida é a *membrana planar de bicamada*. Essa estrutura pode ser formada através de um orifício de 1 mm em um septo entre dois compartimentos aquosos, mergulhando um pincel fino em uma solução formadora de membranas, como fosfatidilcolina em decano, passando a ponta do pincel através do orifício. A película lipídica através do orifício afina-se espontaneamente, formando uma bicamada lipídica. As propriedades de condução elétrica dessa membrana macroscópica de bicamada são facilmente estudadas mediante inserção de eletrodos em ambos os compartimentos aquosos (Figura 12.14). Por exemplo, a permeabilidade da membrana a íons é determinada medindo-se a corrente através da membrana como função da voltagem aplicada.

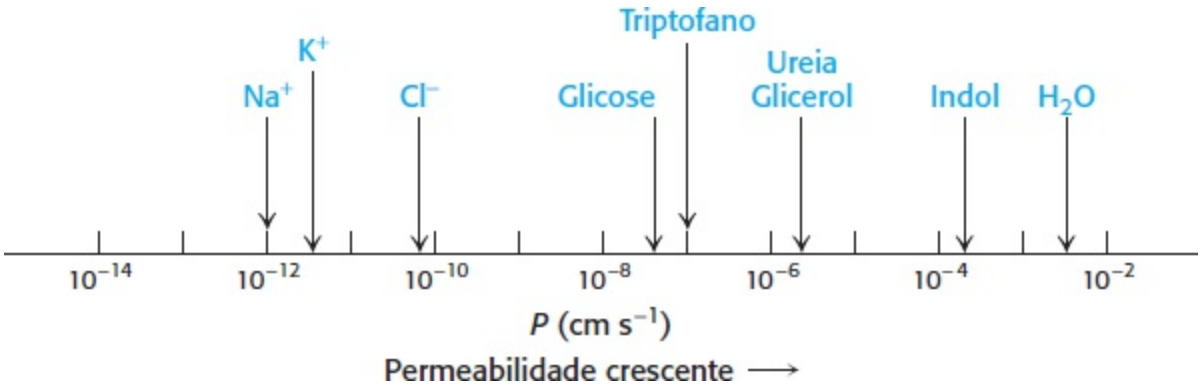


Figura 12.15 Coeficientes de permeabilidade (*P*) de íons e moléculas em uma bicamada lipídica. A capacidade das moléculas de atravessar uma bicamada lipídica é ampla.

As bicamadas lipídicas são altamente impermeáveis a íons e à maioria das moléculas polares

Os estudos de permeabilidade de vesículas lipídicas e medidas de condutância elétrica de bicamadas planares mostraram que *as membranas de bicamada lipídica têm uma permeabilidade muito baixa para íons e para a maioria das moléculas polares.* A água é uma exceção notável a essa generalização; ela atravessa essas membranas com relativa facilidade, em virtude de seu baixo peso molecular, alta concentração e ausência de carga completa. A faixa de coeficientes de permeabilidade medidos é muito ampla (Figura 12.15). Por exemplo, o Na^+ e o K^+ atravessam essas membranas 10^9 vezes mais lentamente do que a H_2O. O triptofano, um *zwitterion* em pH 7, atravessa a membrana 10^3 vezes mais lentamente do que o indol, uma molécula estruturalmente relacionada que carece de grupos iônicos. Com efeito, *a permeabilidade de moléculas pequenas está correlacionada com a sua solubilidade em solvente apolar em relação à sua solubilidade em água.* Essa relação sugere que uma molécula pequena poderia atravessar uma membrana de bicamada lipídica da seguinte maneira: em primeiro lugar, livra-se de sua camada de solvatação de água; em seguida, dissolve-se no cerne hidrocarbonado da membrana; e, por fim, difunde-se através desse cerne para o outro lado da membrana, onde é ressolvatada pela água. Um íon como o Na^+ atravessa a membrana muito lentamente, visto que a substituição de sua camada de coordenação de moléculas polares de água por interações apolares com o interior da membrana é, altamente desfavorável em termos energéticos.

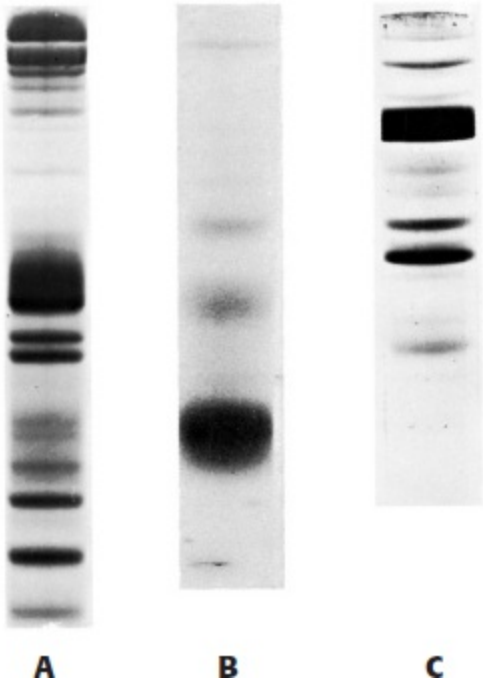


Figura 12.16 Padrões de proteínas de membrana em gel de poliacrilamida-SDS. A. Membrana plasmática de eritrócitos. **B**. Membranas fotorreceptoras de bastonetes da retina. **C**. Membrana do retículo sarcoplasmático de células musculares. [Cortesia do Dr. Theodore Steck (parte A) e do Dr. David MacLennan (parte C).]

12.4 As proteínas realizam a maior parte dos processos da membrana

Discutiremos agora as proteínas de membrana, que são responsáveis pela maioria dos processos dinâmicos realizados pelas membranas. Os lipídios de membrana formam uma barreira de

permeabilidade e, portanto, estabelecem compartimentos, enquanto *as proteínas específicas medeiam quase todas as outras funções das membranas*. Em particular, as proteínas transportam substâncias químicas e informações através da membrana. Os lipídios de membrana criam o ambiente apropriado para a ação dessas proteínas.

As membranas diferem quanto a seu conteúdo de proteínas. A mielina, uma membrana que atua como isolante elétrico em torno de certas fibras nervosas, apresenta baixo conteúdo de proteínas (18%). Lipídios relativamente puros são bem apropriados como isolantes. Em contrapartida, as membranas plasmáticas ou membranas externas da maioria das outras células são muito mais ativas metabolicamente. Elas contêm numerosas bombas, canais, receptores e enzimas. O conteúdo de proteínas dessas membranas plasmáticas é, tipicamente, de 50%. As membranas de transdução de energia, como as membranas internas das mitocôndrias e dos cloroplastos, são as que apresentam maior conteúdo de proteínas, alcançando tipicamente 75%.

Os componentes proteicos de uma membrana podem ser prontamente visualizados por *eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)*. Conforme assinalado anteriormente (p. 73), a mobilidade eletroforética de muitas proteínas em gel contendo SDS depende mais da sua massa do que da carga efetiva da proteína. A Figura 12.16 mostra os padrões de migração em eletroforese em gel de três membranas – a membrana plasmática dos eritrócitos, a membrana fotorreceptora dos bastonetes da retina e a membrana do retículo sarcoplasmático do músculo. É evidente que cada uma dessas três membranas contém muitas proteínas, porém com composição proteica distinta. Em geral, *as membranas que desempenham diferentes funções contêm diferentes repertórios de proteínas.*

As proteínas associam-se de diversas maneiras à bicamada lipídica.

A facilidade com que uma proteína pode ser dissociada de uma membrana indica o grau com que está intimamente associada a ela. Algumas proteínas de membrana podem ser solubilizadas por meios relativamente suaves, como a extração com uma solução de alta força iônica (p.ex., NaCl 1 M). Outras proteínas de membrana ligam-se com muito mais tenacidade; só podem ser solubilizadas com o uso de um detergente ou um solvente orgânico. As proteínas de membrana podem ser classificadas em *periféricas* ou *integrais*, com base nessa diferença de dissociabilidade (Figura 12.17). *As proteínas integrais* interagem extensamente com as cadeias hidrocarbonadas dos lipídios de membrana, de modo que elas só podem ser liberadas por agentes que competem por essas interações apolares. Com efeito, a maioria das proteínas integrais das membranas atravessam a bicamada lipídica. Em contrapartida, as *proteínas periféricas de membrana* estão ligadas às membranas primariamente por interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio às cabeças dos lipídios. Essas interações polares podem ser rompidas pela adição de sais ou pela mudança do pH. Muitas proteínas periféricas de membrana estão ligadas às superfícies de proteínas integrais, no lado citoplasmático ou extracelular da membrana. Outras estão ancoradas à bicamada lipídica por uma cadeia hidrofóbica, como um ácido graxo, ligada covalentemente.

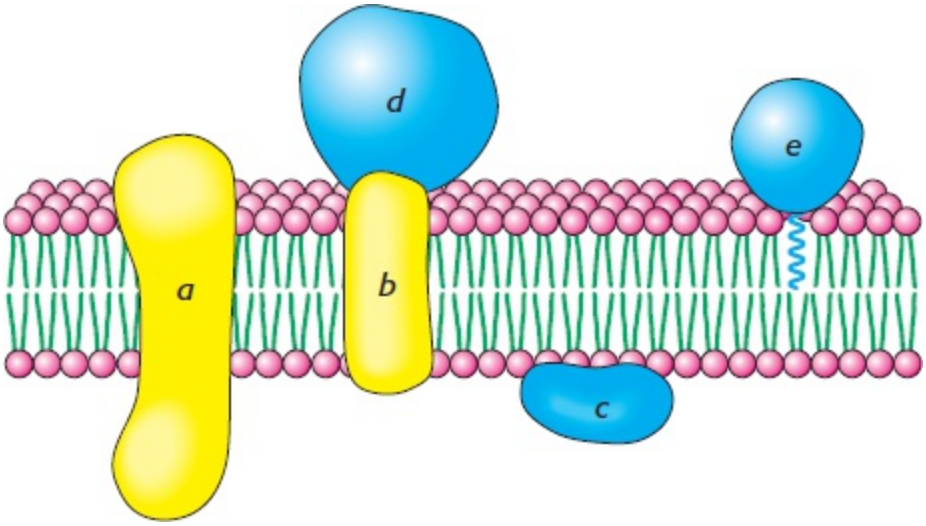


Figura 12.17 Proteínas de membranas integrais e periféricas. As proteínas integrais de membrana (*a* e *b*) interagem extensamente com a região hidrocarbonada da bicamada. A maioria das proteínas integrais de membrana conhecidas atravessa a bicamada lipídica. As proteínas de membranas periféricas interagem com as cabeças polares dos lipídios (*c*) ou ligam-se à superfície de proteínas integrais (*d*). Outras proteínas estão firmemente ancoradas à membrana por uma molécula lipídica ligada covalentemente (*e*).

As proteínas interagem de várias maneiras com as membranas

As proteínas de membrana são mais difíceis de purificar e cristalizar do que as proteínas hidrossolúveis. Além disso, pesquisadores usando métodos de cristalografia de raios X ou de microscopia eletrônica determinaram as estruturas tridimensionais de mais de 200 dessas proteínas, com resolução alta o suficiente para discernir os detalhes moleculares. Conforme assinalado no Capítulo 2, as proteínas de membrana diferem das proteínas solúveis na distribuição dos grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. A seguir, veremos alguns detalhes das estruturas de três proteínas de membranas.

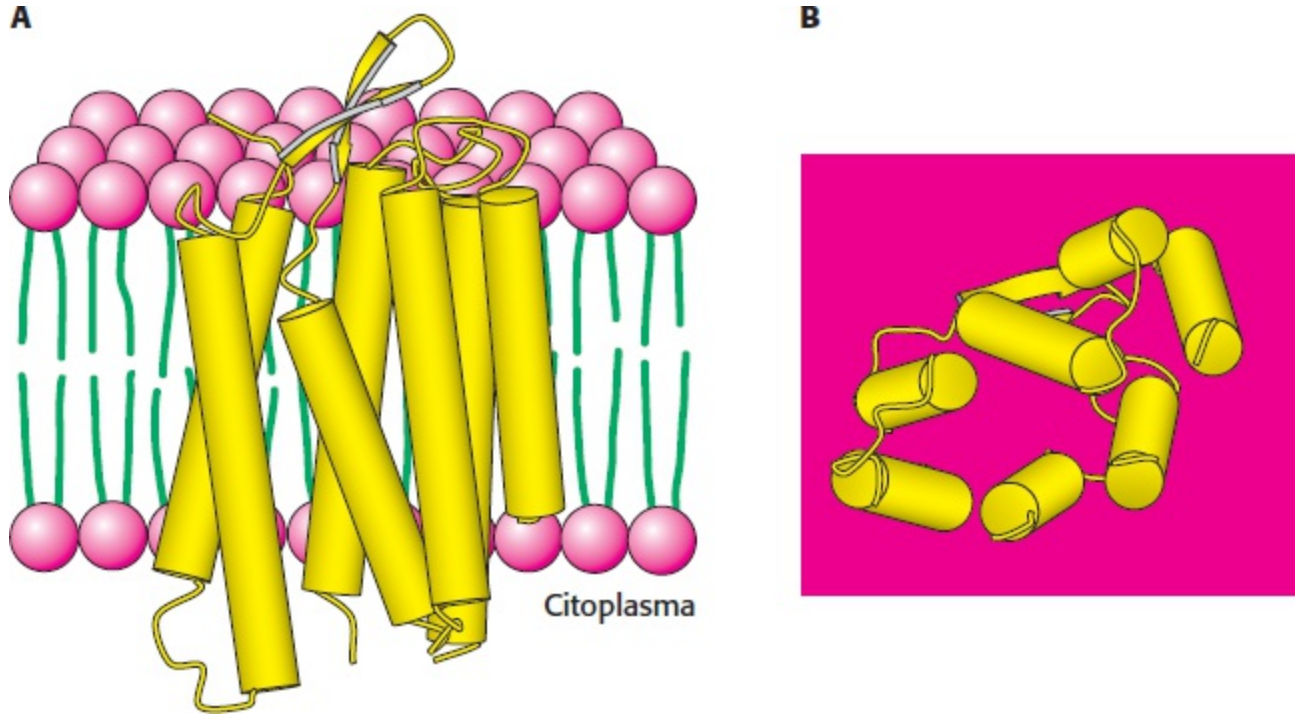


Figura 12.18 Estrutura da bacteriorrodopsina. *Observe* que a bacteriorrodopsina é constituída, em grande parte, de α-hélices que atravessam a membrana (representadas pelos cilindros amarelos). **A.** Vista através da bicamada da

membrana. O interior da membrana é verde, enquanto as cabeças estão representadas em vermelho. **B.** Vista do lado citoplasmático da membrana. [Desenhada a partir de 1BRX.pdb.]

As proteínas podem atravessar a membrana de um lado ao outro com α-hélices. A primeira proteína de membrana que iremos discutir é a proteína de *archaeae*, a bacteriorrodopsina, mostrada na Figura 12.18. Essa proteína utiliza a energia luminosa para transportar prótons do interior da célula para o exterior, gerando um gradiente de prótons usado para formar ATP. A bacteriorrodopsina é constituída quase totalmente de α-hélices; sete α-hélices densamente agrupadas, dispostas quase perpendicularmente ao plano da membrana celular, atravessam os seus de 45 Å de largura. O exame da estrutura primária da bacteriorrodopsina revela que a maioria dos aminoácidos nessas α-hélices transmembranares são apolares, e que apenas alguns têm carga (Figura 12.19). Essa distribuição de aminoácidos apolares é sensível, visto que esses resíduos estão em contato com o cerne de hidrocarbonato da membrana ou um com o outro. *As α-hélices que atravessam a membrana de um lado ao outro constituem o tema estrutural mais comum nas proteínas de membranas*. Como consideraremos na Seção 12.5, essas regiões frequentemente podem ser detectadas pelo exame da sequência de aminoácidos apenas.

```
AQITGRPEWIWLALGTALMGLGTLYFLVKGMGVSDPDAKKFYAITTLVPA
IAFTMYLSMLLGYGLTMVPFGGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLV
DADQGTILALVGADGIMIGTGLVGALTKVYSYRFVWWAISTAAMLYILYV
LFFGFTSKAESMRPEVASTFKVLRNVTVVLWSAYVVVWLIGSEGAGIVPL
NIETLLFMVLDVSAKVGFGLILLRSRAIFGEAEAPEPSADGAAATS
```

Figura 12.19 Sequência de aminoácidos da bacteriorrodopsina. As sete regiões helicoidais estão destacadas em amarelo, enquanto os resíduos com carga estão em vermelho.

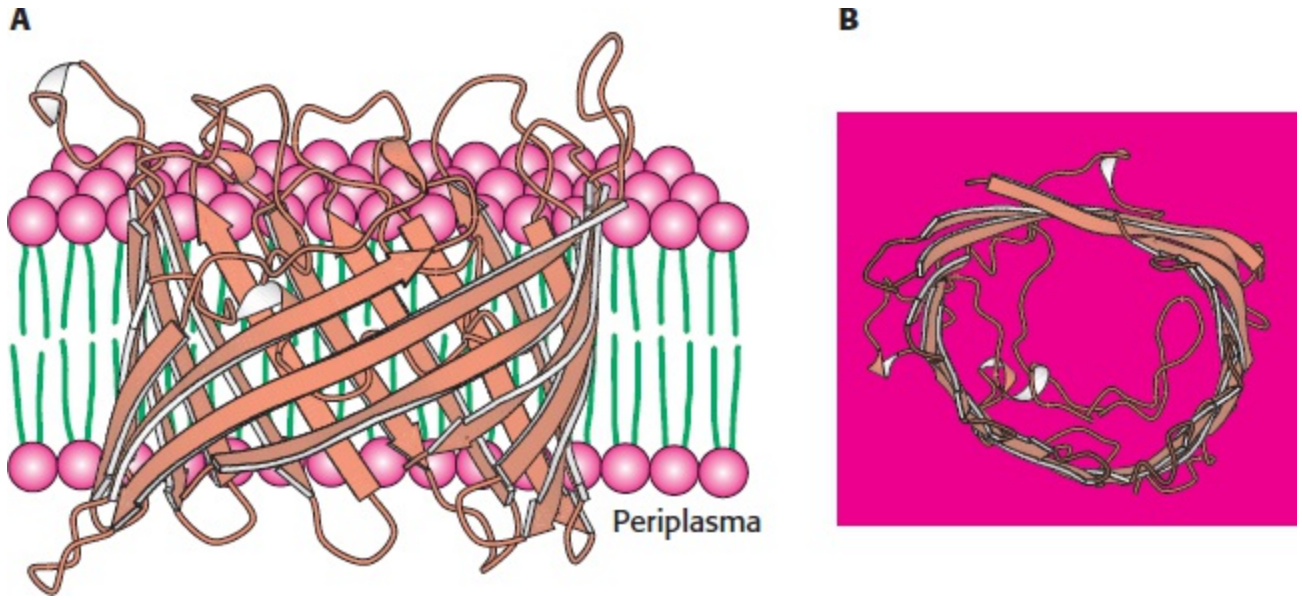


Figura 12.20 Estrutura da porina bacteriana (de *Rhodopseudomonas blastica*). *Observe* que essa proteína de membrana é constituída inteiramente de fitas β. **A.** vista lateral. **B.** Vista a partir do espaço periplasmático. Observa-se apenas um monômero da proteína trimérica. [Desenhada a partir de 1PRN.pdb.]

Uma proteína de canal pode ser formada a partir de fitas beta. A porina, uma proteína da membrana externa de bactérias como *E. coli* e *Rhodobacter capsulatus*, representa uma classe de proteínas de membrana com um tipo de estrutura completamente diferente. As estruturas desse tipo são construídas a partir de fitas β e não contêm essencialmente nenhuma α-hélice (Figura 12.20).

A disposição das fitas β é muito simples: cada fita é ligada à sua vizinha por pontes de hidrogênio, em um arranjo antiparalelo, formando uma única folha β. A folha β curva-se para formar um cilindro oco que, como o próprio nome sugere, forma um poro ou canal na membrana. A superfície externa da porina é apropriadamente apolar, tendo em vista que ela interage com o cerne hidrocarbonado da membrana. Em contrapartida, o interior do canal é muito hidrofílico e repleto de água. Esse arranjo de superfícies apolares e polares é obtido pela alternância de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos ao longo de cada fita β (Figura 12.21).

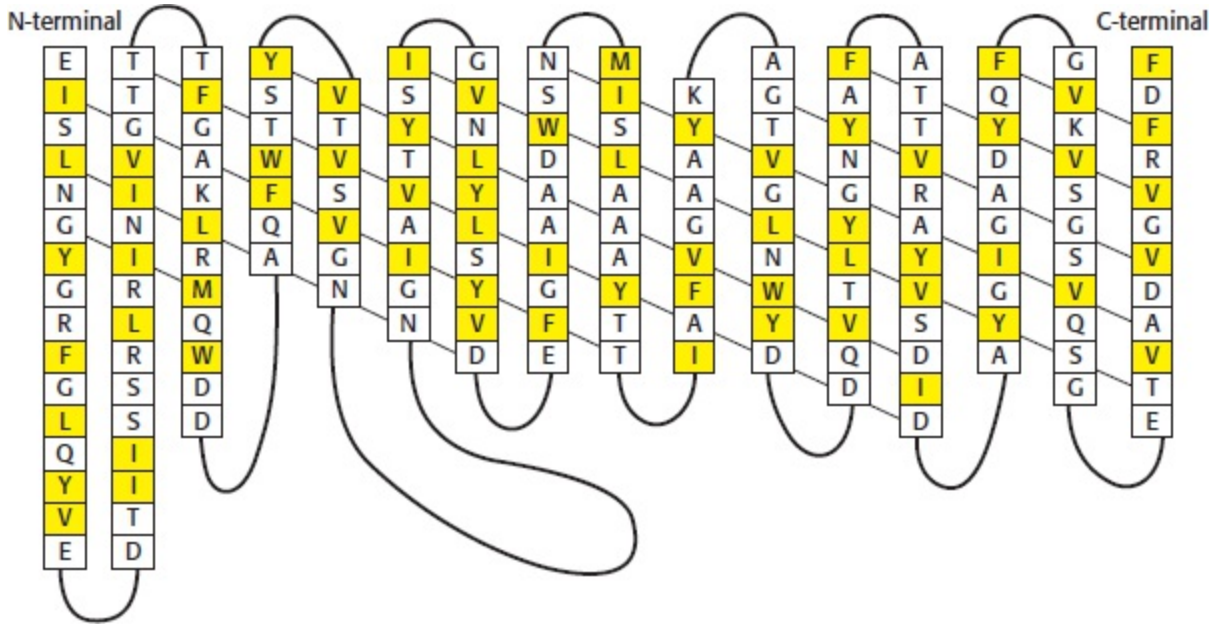


Figura 12.21 Sequência de aminoácidos de uma porina. Algumas proteínas de membranas, como as porinas, são constituídas de fitas β que tendem a apresentar aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos em posições adjacentes. A figura mostra a estrutura secundária da porina de *Rhodopseudomonas blastica*, em que as linhas diagonais indicam a direção das pontes de hidrogênio ao longo da folha β. Os resíduos hidrofóbicos (F, I, L, M, V, W e Y) são mostrados em amarelo. Esses resíduos tendem a se localizar no lado externo da estrutura, em contato com o cerne hidrofóbico da membrana.

A inserção de parte de uma proteína a uma membrana pode ligá-la à superfície da membrana. A estrutura da enzima prostaglandina H_2 sintase 1 ligada à membrana do retículo endoplasmático revela um papel bastante diferente para as α-hélices com relação à associação de proteínas às membranas. Essa enzima catalisa a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina H_2 em duas etapas: (1) uma reação de ciclo-oxigenase e (2) uma reação de peroxidase (Figura 12.22). A prostaglandina H_2 promove a inflamação e modula a secreção de ácido gástrico. A enzima que produz a prostaglandina H_2 é um homodímero com uma estrutura bastante complicada que consiste principalmente em α-hélices. Diferentemente da bacteriorrodopsina, essa proteína não está em grande parte inserida na membrana. Com efeito, situa-se ao longo da superfície externa da membrana, firmemente ligada por um conjunto de α-hélices com superfícies hidrofóbicas que se estendem da base da proteína para dentro da membrana (Figura 12.23). Essa ligação é suficientemente forte, de modo que apenas a ação de detergentes consegue liberar a proteína da membrana. Por conseguinte, essa enzima é classificada como uma proteína integral de membrana, embora ela não atravesse a membrana de um lado ao outro.

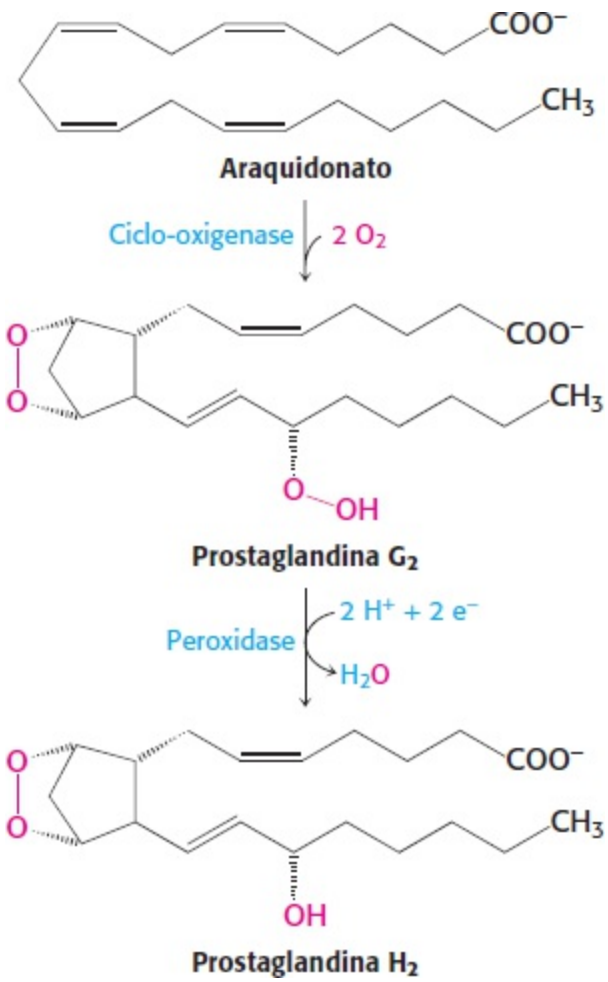


Figura 12.22 Formação da prostaglandina H_2. A prostaglandina H_2 sintase 1 catalisa a formação da prostaglandina H_2-partir do ácido araquidônico, em duas etapas.

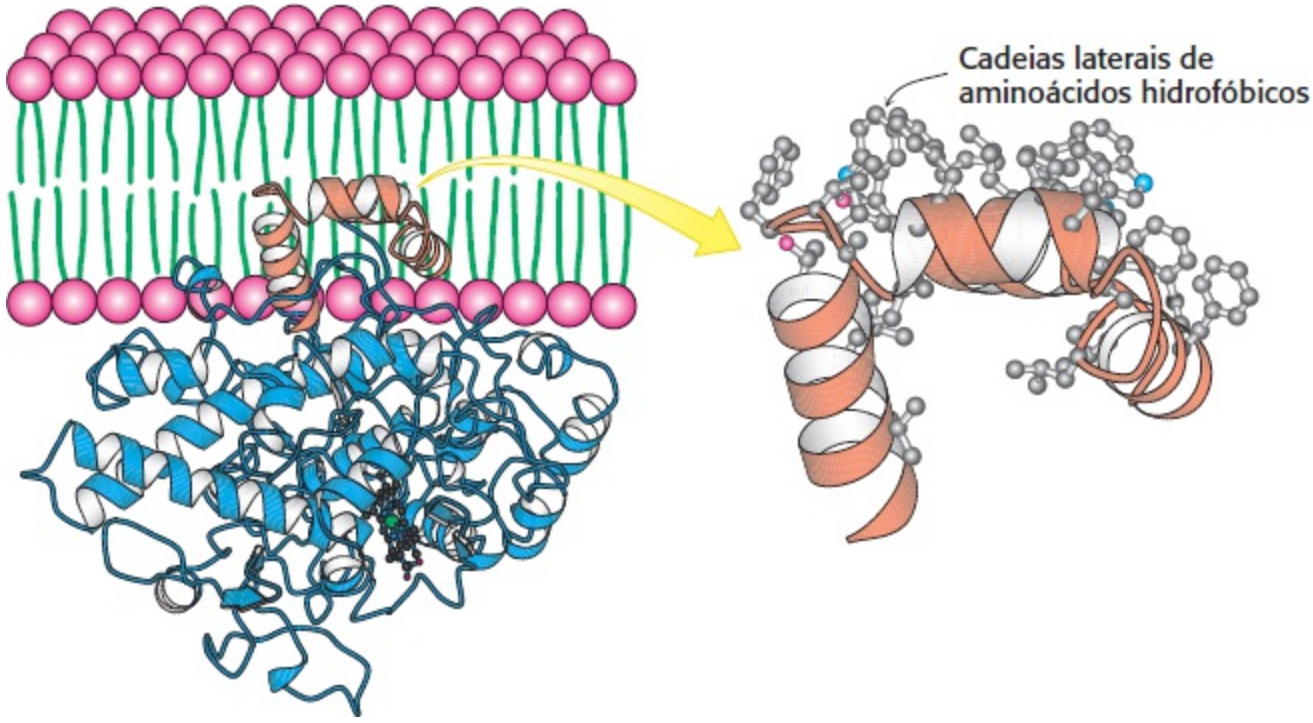


Figura 12.23 Fixação da prostaglandina H_2 sintase 1 à membrana. *Observe* que a prostaglandina H_2 sintase 1 é mantida na membrana por um conjunto de α-hélices (laranja) recobertas por cadeias laterais hidrofóbicas. A figura mostra um monômero da enzima dimérica. [Desenhada a partir de 1PTH.pdb.]

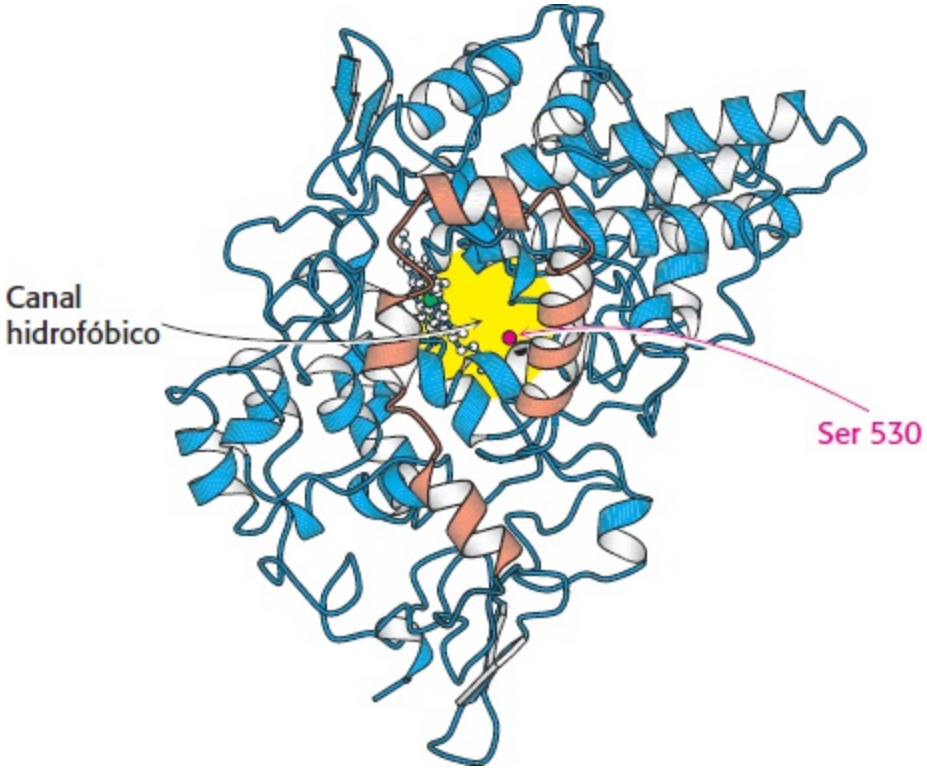


Figura 12.24 Canal hidrofóbico da prostaglandina H_2 sintase 1. Uma vista da prostaglandina H_2 sintase 1 a partir da membrana mostra o canal hidrofóbico que leva ao sítio ativo. As hélices de ancoragem à membrana são mostradas em laranja. [Desenhada a partir de 1PTH.pdb.]

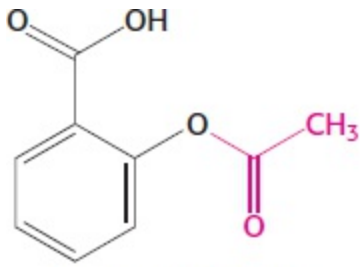
A localização da prostaglandina H_2 sintase 1 na membrana é crucial para o desempenho de sua função. O substrato para essa enzima, o ácido araquidônico, é uma molécula hidrofóbica gerada pela hidrólise de lipídios da membrana. O ácido araquidônico alcança o sítio ativo da enzima a partir da membrana, sem entrar em contato com um ambiente aquoso, penetrando por um canal hidrofóbico na proteína (Figura 12.24). Certamente já percebemos a importância desse canal: medicamentos como o ácido acetilsalicílico e o ibuprofeno bloqueiam o canal e impedem a síntese de prostaglandinas ao inibir a atividade de ciclo-oxigenase da sintase. Em particular, o ácido acetilsalicílico atua por meio da transferência de seu grupo acetila para um resíduo de serina (Ser 350), encontrado ao longo do trajeto que leva ao sítio ativo (Figura 12.25).

Duas características importantes emergem do exame desses três exemplos de estrutura de proteínas de membrana. Em primeiro lugar, as partes da proteína que interagem com as partes hidrofóbicas da membrana são recobertas por cadeias laterais de aminoácidos apolares, enquanto as que interagem com o ambiente aquoso são muito mais hidrofílicas. Em segundo lugar, as estruturas localizadas dentro da membrana são muito regulares e, em particular, todos os doadores e receptores de pontes de hidrogênio no arcabouço participam nas pontes de hidrogênio. *A quebra de uma ponte de hidrogênio dentro de uma membrana é muito desfavorável, visto que pouca ou nenhuma água está presente para competir pelos grupos polares.*

Algumas proteínas associam-se às membranas por meio de grupos hidrofóbicos ligados de modo covalente

As proteínas de membrana consideradas até agora se associam à membrana por meio de superfícies geradas por cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos. Entretanto, até mesmo proteínas solúveis nos demais aspectos podem se associar a membranas se a ligação for feita por grupos hidrofóbicos.

Três desses grupos estão ilustrados na Figura 12.26: (1) um grupo palmitila ligado a um resíduo específico de cisteína por uma ligação tioéster, (2) um grupo farnesila ligado a um resíduo de cisteína na extremidade carboxiterminal e (3) uma estrutura glicolipídica denominada âncora de glicosilfosfatidil inositol (GPI) ligada à extremidade carboxiterminal. Essas modificações estão ligadas por sistemas enzimáticos que reconhecem sequências sinalizadoras próximas ao sítio de ligação.



Ácido acetilsalicílico
(aspirina)

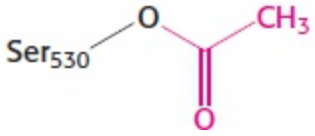
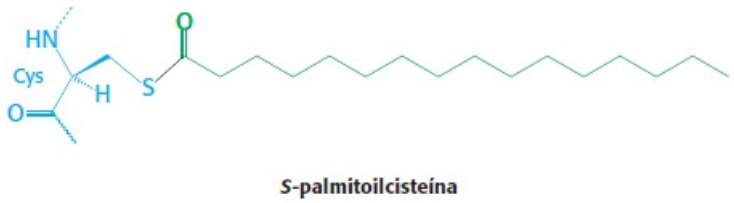
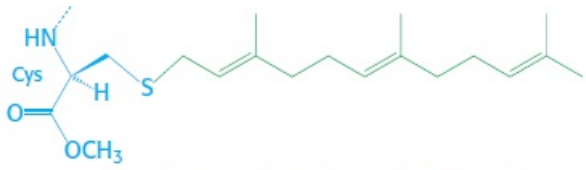


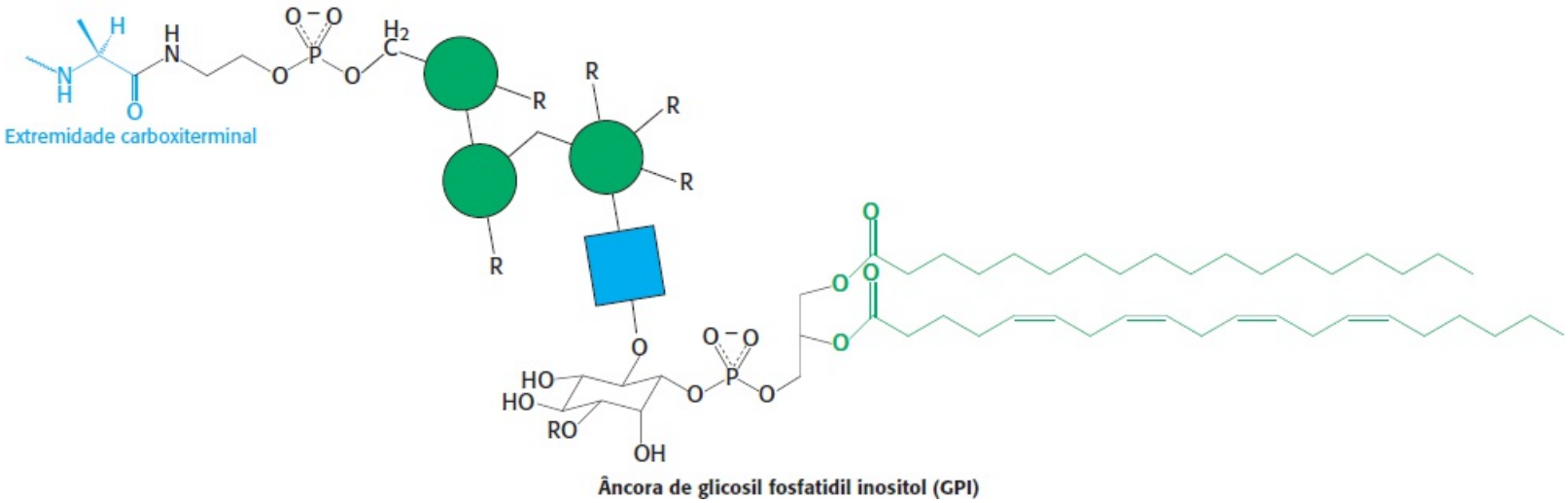
Figura 12.25 Efeitos do ácido acetilsalicílico sobre a prostaglandina H_2 sintase 1. O ácido acetilsalicílico atua pela transferência de um grupo acetila para um resíduo de serina na prostaglandina H_2 sintase 1.



S-palmitoilcisteína



Metil éster de *S*-farnesil cisteína C-terminal



Âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI)

Figura 12.26 Âncoras de membrana. As âncoras de membrana são grupos hidrofóbicos que se ligam de modo covalente a proteínas (em azul) e as fixam à membrana. Os círculos verdes e o quadrado azul correspondem à manose e GlcNAc, respectivamente. Os grupos R representam pontos de modificação adicional.

Tabela 12.2 Escala de polaridade para a identificação de hélices transmembranares.

Resíduo de aminoácido	Energia livre de transferência em kJ mol−1 (kcal mol−1)

Phe	15,5 (3,7)
Met	14,3 (3,4)
Ile	13,0 (3,1)
Leu	11,8 (2,6)
Val	10,9 (2,6)
Cys	8,4 (2,0)
Trp	8,0 (1,9)
Ala	6,7 (1,6)
Thr	5,0 (1,2)
Gly	4,2 (1,0)
Ser	2,5 (0,6)
Pro	−0,8 (−0,2)
Tyr	−2,9 (−0,7)
His	−12,6 (−3,0)
Gln	−17,2 (−4,1)
Asn	−20,2 (−4,8)
Glu	−34,4 (−8,2)
Lys	−37,0 (−8,8)
Asp	−38,6 (−9,2)
Arg	−51,7 (−12,3)

Fonte: Segundo D. M. Engelman, T. A. Steitz e A. Goldman. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15 (1986): 321-353.
Nota: As energias livres são usadas para a transferência de um resíduo de aminoácido em uma α-hélice a partir do interior da membrana (que supostamente tem uma constante dielétrica de 2) para a água.

As hélices transmembranares podem ser previstas de modo acurado a partir das sequências dos aminoácidos

Muitas proteínas de membrana, como a bacteriorrodopsina, empregam α-hélices para atravessar a parte hidrofóbica de uma membrana. Conforme assinalado anteriormente, a maioria dos resíduos nessas α-hélices tipicamente é apolar, e quase nenhum deles tem carga. Podemos usar essa

informação para identificar possíveis regiões que atravessam as membranas, baseando-se exclusivamente nos dados de sequência? Uma maneira de identificar as hélices transmembranares é questionar onde um segmento helicoidal postulado provavelmente é mais estável, se em um ambiente hidrocarbonado ou na água. Especificamente, queremos estimar a mudança de energia livre quando um segmento helicoidal é transferido do interior de uma membrana para a água. A Tabela 12.2 fornece as mudanças de energia livre para a transferência de resíduos individuais de aminoácidos de um ambiente hidrofóbico para um aquoso. Por exemplo, a transferência de uma hélice formada inteiramente de resíduos de L-argenina, um aminoácido de carga positiva, do interior de uma membrana para a água seria altamente favorável [– 51,5 kJ mol^{-1} (– 12,3 kcal mol^{-1}) por resíduo de argenina na hélice]. Em contrapartida, a transferência de uma hélice totalmente formada de L-fenilalanina, um aminoácido hidrofóbico, seria desfavorável [+ 15,5 kJ mol^{-1} (+ 3,7 kcal mol^{-1}) por resíduo de fenilalanina na hélice].

O cerne hidrocarbonado de uma membrana tem, tipicamente, 30 Å de largura, um comprimento que pode ser atravessado por uma α-hélice constituída de 20 resíduos. Podemos considerar uma sequência de aminoácidos de uma proteína e estimar a mudança de energia livre que ocorre quando uma α-hélice hipotética formada pelos resíduos 1 a 20 é transferida do interior da membrana para a água. O mesmo cálculo pode ser feito para os resíduos 2 a 21, 3 a 22, e assim por diante, até alcançar o final da sequência. O segmento de 20 resíduos escolhidos para esse cálculo é denominado *janela*. A mudança de energia livre para cada janela é representada graficamente contra o primeiro aminoácido na janela, criando um *gráfico de hidropatia*. Empiricamente, um pico de + 84 kJ mol^{-1} (+ 20 kcal mol^{-1}) ou mais em um gráfico de hidropatia, baseado em uma janela de 20 aminoácidos, indica que um segmento polipeptídico poderia ser uma α-hélice transmembranar. Por exemplo, com base nesse critério, pode-se prever que a glicoforina, uma proteína encontrada nas membranas dos eritrócitos, tenha uma hélice transmembranar, de acordo com os achados experimentais (Figura 12.27). Todavia, observe que um pico no gráfico de hidropatia não prova que um segmento seja uma hélice transmembranar. Até mesmo proteínas solúveis podem ter regiões altamente apolares. Por outro lado, algumas proteínas de membrana contêm características transmembranares (como, por exemplo, um conjunto de fitas β formando um cilindro) que escapam da detecção por esses gráficos (Figura 12.28).

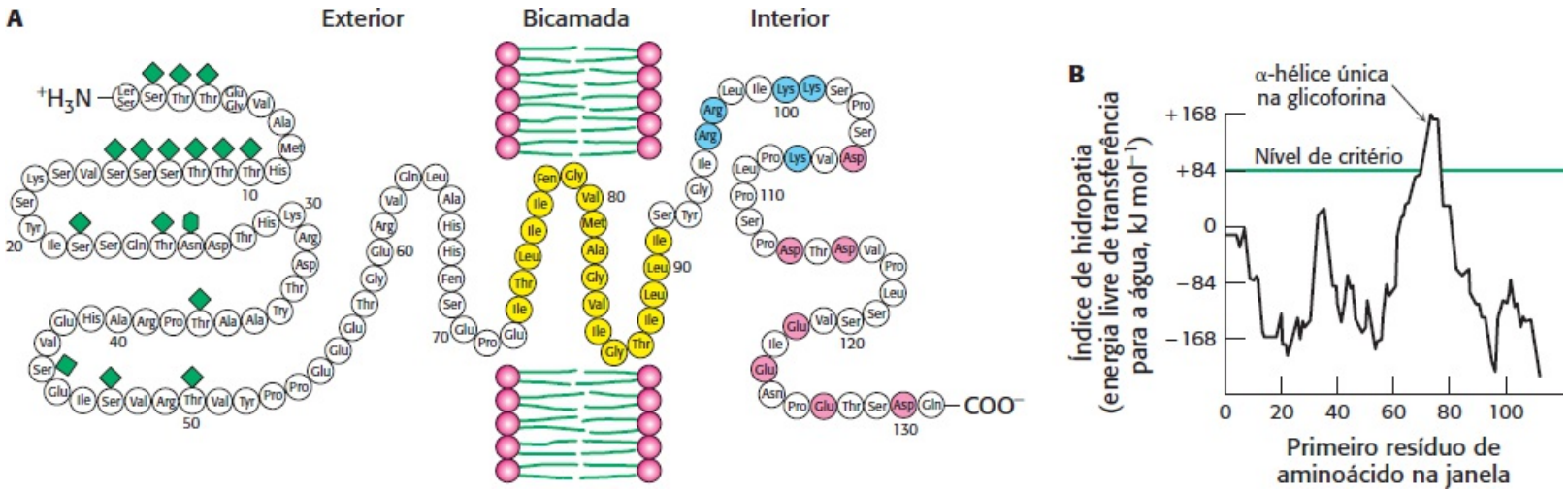


Figura 12.27 Localização da hélice de glicoforina que atravessa a membrana de um lado ao outro. A. Sequência de aminoácidos e disposição transmembranar da glicoforina A da membrana eritrocitária. Quinze unidades de carboidrato de ligação *O* são representadas na forma de losangos, e uma unidade N-ligada é representada por um hexágono. Os resíduos

hidrofóbicos (em amarelo) mergulhados na bicamada formam uma α-hélice transmembranar. A parte carboxiterminal da molécula, localizada no lado citoplasmático da membrana, é rica em resíduos de carga negativa (vermelhos) e de carga positiva (azuis). **B.** Gráfico de hidropatia para a glicoforina. A energia livre para a transferência de uma hélice de 20 resíduos da membrana para a água é representada graficamente em função da posição do primeiro resíduo da hélice na sequência da proteína. Picos de mais de 84 kJ mol^{-1} (+ 20 kcal mol^{-1}) em gráficos de hidropatia indicam potenciais hélices transmembranares. [(A) Cortesia do Dr. Vincent Marchesi; (B) de D.D. Engelman, T. A. Steitz and A. Goldman. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.15:* 321-353, 1986. Copyright © 1986 by Annual Reviews, Inc. Todos os direitos reservados.]

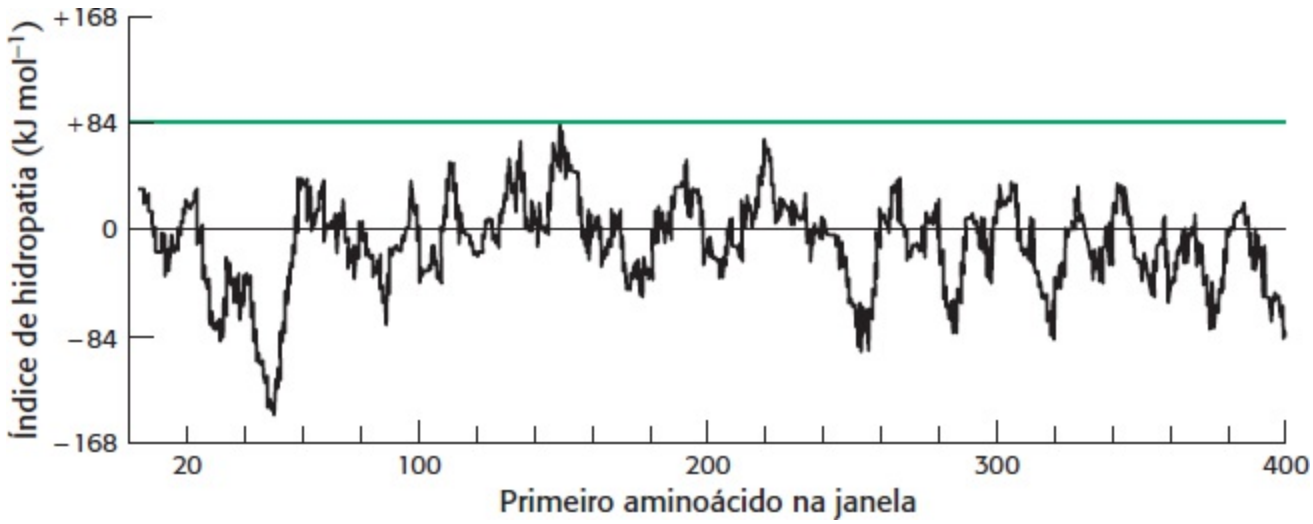


Figura 12.28 Gráfico de hidropatia para a porina. Não se observa nenhum pico acentuado para essa proteína intrínseca de membrana, visto que é construída a partir de fitas β que atravessa a membrana, em lugar de α-hélices.

12.5 Os lipídios e muitas proteínas de membrana difundem-se rapidamente no plano da membrana

As membranas biológicas não são estruturas rígidas e estáticas. Pelo contrário, os lipídios e muitas proteínas de membrana estão em constante movimento lateral, um processo denominado *difusão lateral*. O rápido movimento lateral das proteínas de membrana foi visualizado por meio da microscopia de fluorescência, utilizando-se a técnica de *recuperação de fluorescência após fotodegradação* (FRAP; *fluorescence recovery after photobleaching,* Figura 12.29). Em primeiro lugar, um componente da superfície da célula é marcado especificamente com um cromóforo fluorescente. Uma pequena região da superfície da célula (cerca de 3 μm^2) é examinada por microscópio de fluorescência. As moléculas fluorescentes nessa região são então destruídas (degradadas) por um pulso luminoso muito intenso de um *laser*. A fluorescência dessa região é subsequentemente monitorada em função do tempo, utilizando-se um nível luminoso suficientemente baixo para impedir qualquer degradação adicional. Se o componente marcado for móvel, as moléculas degradadas saem da região, enquanto as moléculas não degradadas entram nessa região iluminada, resultando em aumento da intensidade de fluorescência. A velocidade de recuperação da fluorescência depende da mobilidade lateral do componente marcado com fluorescência, que pode ser expresso em termos de um coeficiente de difusão, D. A distancia média S atravessada no tempo t depende do D, de acordo com a seguinte expressão

$$S = (4Dt)^{1/2}$$

O coeficiente de difusão dos lipídios em uma variedade de membranas é de cerca de 1 $\mu m^2\ s^{-1}$.

Por conseguinte, uma molécula de fosfolipídios difunde-se por uma distância média de 2 μm em 1 s. *Essa velocidade significa que uma molécula de lipídio pode se locomover de uma extremidade de uma bactéria para outra em um segundo*. A magnitude do coeficiente de difusão observado indica que a viscosidade da membrana é 100 vezes a da água, ou seja, bastante semelhante à do azeite de oliva.

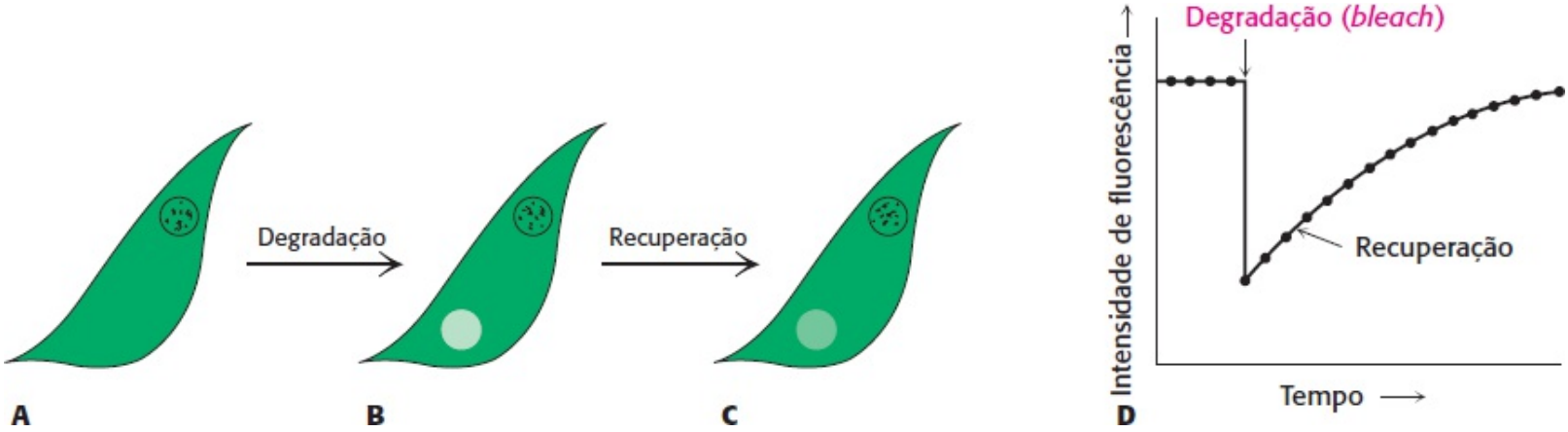


Figura 12.29 Técnica de recuperação de fluorescência após *fotodegradação (photobleaching)* **(FRAP). A.** A superfície da célula fluoresce, devido a um componente de superfície marcado. **B.** As moléculas fluorescentes de uma pequena parte da superfície são degradadas por um pulso luminoso intenso. **C.** A intensidade de fluorescência recupera-se à medida que as moléculas degradadas se difundem para fora da região, enquanto as moléculas não degradadas sofrem difusão para a região. **D.** A velocidade de recuperação depende do coeficiente de difusão.

Em contrapartida, as proteínas variam acentuadamente na sua mobilidade lateral. *Algumas proteínas são quase tão móveis quanto os lipídios, enquanto outras são praticamente imóveis*. Por exemplo, a rodopsina (Seção 33.3), a proteína fotorreceptora, que é muito móvel, tem um coeficiente de difusão de 0,4 $\mu m^2\ s^{-1}$. O movimento rápido da rodopsina é essencial para uma sinalização rápida. No outro extremo, encontra-se a fibronectina, uma glicoproteína periférica que interage com a matriz extracelular. Para a fibronectina, D é inferior a $10^{-4}\ \mu m^2\ s^{-1}$. A fibronectina apresenta uma mobilidade muito baixa, visto que está ancorada a filamentos de actina no outro lado da membrana plasmática por meio da *integrina*, uma proteína transmembranar que liga a matriz extracelular ao citoesqueleto.

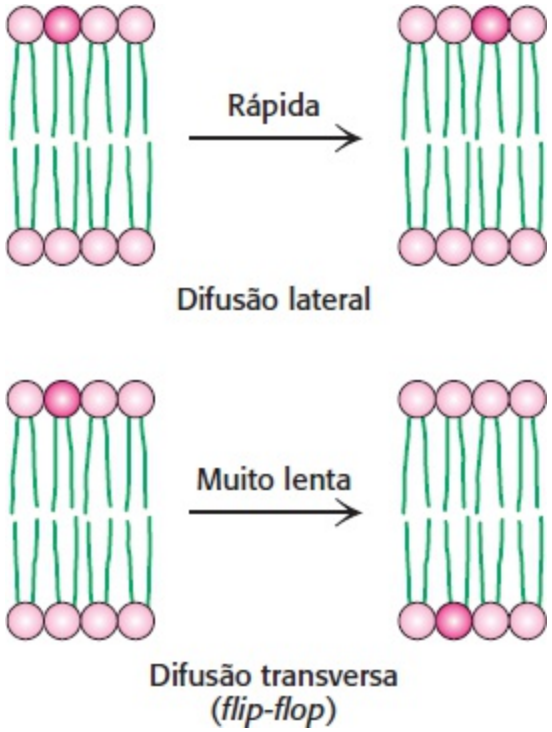


Figura 12.30 Movimento dos lipídios nas membranas. A difusão lateral dos lipídios é muito mais rápida que a difusão transversa (*flip-flop*).

O modelo do mosaico fluido possibilita o movimento lateral, mas não a rotação através da membrana

Com base na mobilidade das proteínas nas membranas, Jonathan Singer e Garth Nicolson propuseram, em 1972, um *modelo do mosaico fluido* para descrever a organização global das membranas biológicas. A essência de seu modelo é que as *membranas são soluções bidimensionais de lipídios orientados e de proteínas globulares*. A bicamada lipídica desempenha um papel duplo: atua tanto como *solvente* para proteínas integrais da membrana quanto *barreira de permeabilidade*. As proteínas de membrana são livres para se difundirem lateralmente na matriz lipídica, a não ser que sejam restritas por interações especiais.

Embora a difusão lateral dos componentes da membrana possa ser rápida, a rotação espontânea dos lipídios de uma face de uma membrana para outra é um processo muito lento. A transição de uma molécula de uma superfície da membrana para outra é denominada *difusão transversal, ou flip-flop* (Figura 12.30). O *flip-flop* de moléculas de fosfolipídio em vesículas de fosfatidilcolina foi medido diretamente por técnicas de ressonância de *spin* de elétrons que mostram que *uma molécula de fosfolipídio sofre difusão transversa uma vez em várias horas*. Por conseguinte, uma molécula de fosfolipídio leva cerca de 10^9 vezes mais tempo para se difundir transversalmente através de uma membrana do que para se difundir por uma membrana de 50 Å no sentido lateral. As barreiras de energia livre à difusão transversa são ainda maiores para as moléculas de proteína do que para os lipídios, visto que as proteínas apresentam regiões polares mais extensas. Com efeito, não foi observada a ocorrência de *flip-flop* de uma molécula de proteína. Por conseguinte, *a assimetria da membrana pode ser preservada por longos períodos de tempo.*

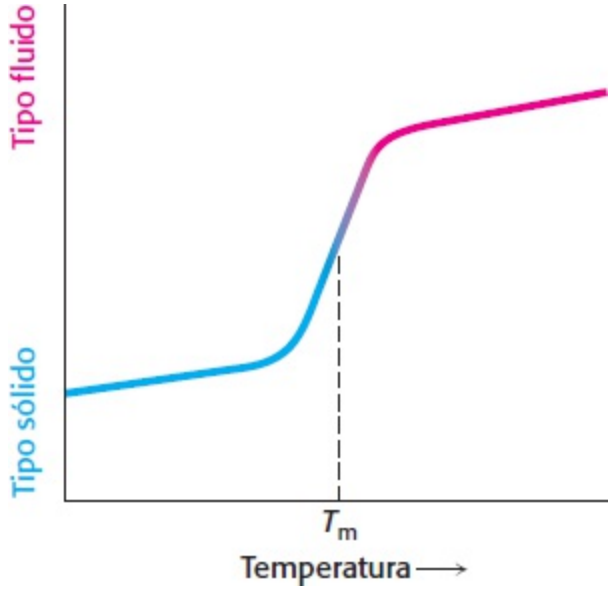


Figura 12.31 Temperatura de transição de fase ou de fusão (T*m*) para uma membrana de fosfolipídios. À medida que a temperatura é elevada, a membrana de fosfolipídios passa de um estado acondicionado e ordenado para um estado mais aleatório.

Tabela 12.3 Temperatura de fusão da fosfatidilcolina contendo diferentes pares de cadeias idênticas de ácidos graxos.

		Ácido graxo		
Número de carbonos	Número de duplas ligações	Nome trivial	Nome científico	*Tm* (°C)
22	0	Beenato	*n*-Docosanoato	75
18	0	Estearato	*n*-Octadecanoato	58
16	0	Palmitato	*n*-Hexadecanoato	41
14	0	Miristato	*n*-Tetradecanoato	24
18	1	Oleato	*cis*-Δ9-Octadecenoato	−22

A fluidez da membrana é controlada pela composição de ácidos graxos e pelo conteúdo de colesterol

Muitos processos de membrana, como transporte e transdução de sinais, dependem da fluidez dos lipídios de membrana, que, por sua vez, depende das propriedades das cadeias de ácidos graxos. As cadeias de ácidos graxos nas bicamadas da membrana podem existir em um estado ordenado e rígido, ou em um estado fluido e relativamente desordenado. A transição do estado rígido para o fluido ocorre de modo abrupto quando a temperatura é elevada acima da T_m, a temperatura de fusão (Figura 12.31). *Essa temperatura de transição depende do comprimento das cadeias de ácidos graxos e de seu grau de insaturação* (Tabela 12.3). A presença de ácidos graxos saturados favorece o estado rígido, visto que suas cadeias hidrocarbonadas retas interagem de modo muito favorável umas com as outras. Por outro lado, *uma dupla ligação cis, produz uma curva na cadeia hidrocarbonada. Essa curva interfere no acondicionamento altamente ordenado das cadeias de*

ácidos graxos e, portanto, a Tm *é diminuída* (Figura 12.32). O comprimento da cadeia de ácido graxo também afeta a temperatura de transição. As cadeias hidrocarbonadas longas interagem mais fortemente do que as curtas. Especificamente, cada grupo —CH_2— adicional faz uma contribuição favorável de cerca de –2 kJ mol^{-1} (–0,5 kcal mol^{-1}) para a energia livre de interação de duas cadeias hidrocarbonadas adjacentes.

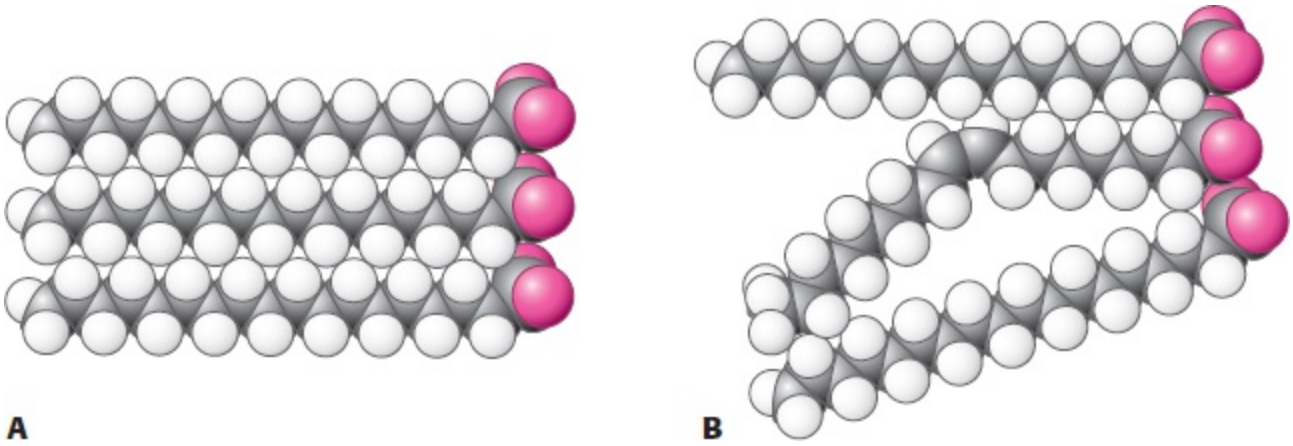


Figura 12.32 Acondicionamento de cadeias de ácidos graxos em uma membrana. O acondicionamento altamente ordenado das cadeias de ácidos graxos é perturbado pela presença de duplas ligações cis. Os modelos de preenchimento atômico mostram o acondicionamento de (**A**) três moléculas de estearato (C_{18}, saturado) e (**B**) uma molécula de oleato (C_{18}, insaturado), entre duas moléculas de estearato.

As bactérias regulam a fluidez de suas membranas ao variar o número de duplas ligações e o comprimento de suas cadeias de ácidos graxos. Por exemplo, a razão entre cadeias de ácidos graxos saturadas e insaturadas na membrana de *E. coli* diminui de 1,6 para 1,0 quando a temperatura de crescimento é reduzida de 42°C para 27°C. Essa diminuição na proporção de resíduos saturados impede que a membrana se torne demasiado rígida em temperatura mais baixa.

Nos animais, o colesterol constitui o regulador principal da fluidez da membrana. O colesterol contém um núcleo esteroide volumoso, com um grupo hidroxila em uma extremidade e uma cauda hidrocarbonada flexível na outra. O colesterol insere-se em bicamadas com o seu eixo maior perpendicular ao plano da membrana. O grupo hidroxila do colesterol forma uma ponte de hidrogênio com o átomo de oxigênio carbonila de uma cabeça de fosfolipídio, enquanto a sua cauda hidrocarbonada se localiza no cerne apolar da bicamada. A forma diferente do colesterol em comparação com as dos fosfolipídios perturba as interações regulares entre as cadeias de ácidos graxos (Figura 12.33).

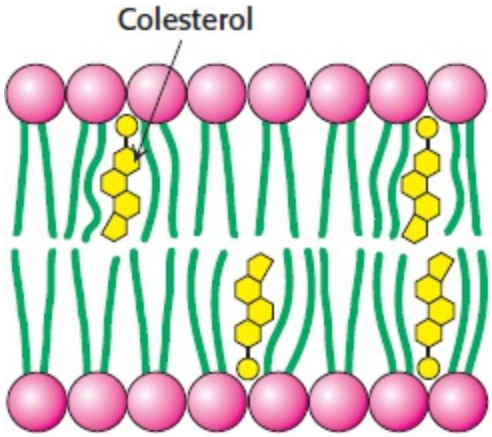


Figura 12.33 O colesterol rompe o estreito acondicionamento das cadeias de ácidos graxos. [De S. L. Wolfe, *Molecular and Cellular Biology* (Wadsworth, 1993).]

As balsas lipídicas (*lipid rafts*) são complexos altamente dinâmicos formados entre o colesterol e lipídios específicos

Além de seus efeitos inespecíficos sobre a fluidez da membrana, o colesterol pode formar complexos específicos com lipídios que contêm o arcabouço de esfingosina, incluindo esfingomielina e determinados glicolipídios, e com proteínas com âncoras de GPI. Esses complexos concentram-se dentro de regiões pequenas (10 a 200 nm) e altamente dinâmicas nas membranas. As estruturas assim formadas são frequentemente descritas como *balsas lipídicas*. Um resultado dessas interações é a *moderação da fluidez da membrana*, tornando-a menos fluida, porém ao mesmo tempo menos sujeita a transições de fases. Por conseguinte, a presença de balsas lipídicas representa uma modificação do modelo do mosaico fluido original para as membranas biológicas. Embora o seu estudo tenha sido muito difícil, em virtude de seu pequeno tamanho e de sua natureza dinâmica, parece que as balsas lipídicas podem desempenhar um papel na concentração de proteínas que participam de vias de transdução de sinal; além disso, elas também podem atuar para regular a curvatura e o brotamento das membranas.

Todas as membranas biológicas são assimétricas

As membranas são estrutural e funcionalmente assimétricas. As superfícies externa e interna de *todas as membranas biológicas conhecidas apresentam diferentes componentes e atividades enzimáticas também diferentes.* Um exemplo bem definido é a bomba que regula a concentração de íons Na^+ e K^+ nas células (Figura 12.34). Essa proteína transportadora está localizada na membrana plasmática de quase todas as células dos organismos superiores. A bomba de Na^+–K^+ é orientada de modo a bombear o Na^+ para fora da célula e o K^+ para dentro. Além disso, o ATP precisa estar no interior da célula para acionar a bomba. A ouabaína, um inibidor específico da bomba, só é efetiva se estiver localizada no lado externo. Analisaremos o mecanismo dessa bomba importante e fascinante e de outras bombas de sua família no Capítulo 13.

As proteínas de membrana exibem uma orientação singular, visto que, após a sua síntese, são inseridas na membrana de modo assimétrico. Essa assimetria absoluta é preservada, já que as proteínas de membrana não podem passar de um lado da membrana para o outro (rotar) e as *membranas são sempre sintetizadas pelo crescimento de membranas preexistentes.* Os lipídios também exibem uma distribuição assimétrica, em consequência de seu modo de biossíntese; todavia, essa assimetria não é habitualmente absoluta, exceto no caso dos glicolipídios. Na membrana dos eritrócitos, a esfingomileina e a fosfatidilcolina estão preferencialmente localizadas no folheto externo da bicamada, enquanto a fosfatidiletalonamina e a fosfatidilserina estão localizadas principalmente no folheto interno. Verifica-se a presença de grandes quantidades de colesterol em ambos os folhetos.

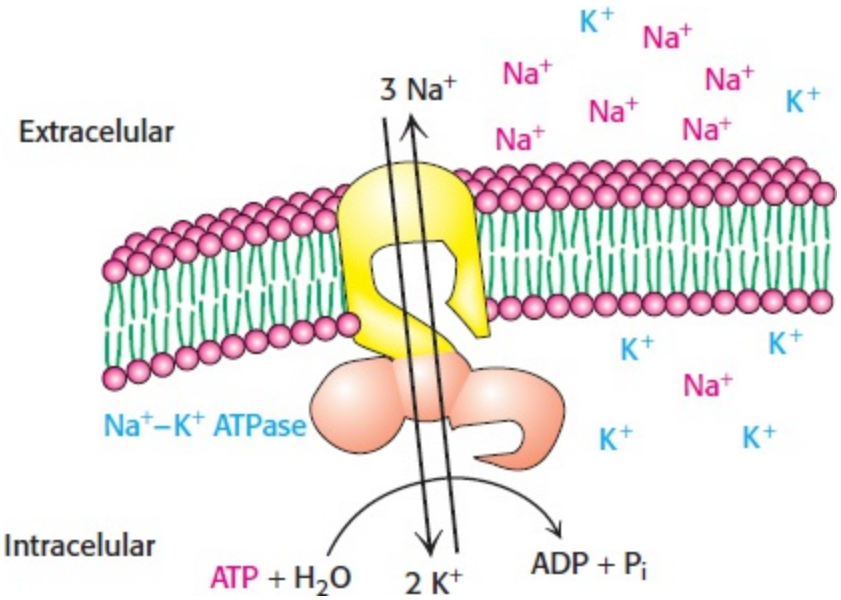


Figura 12.34 Assimetria do sistema de transporte de Na^+–K^+ nas membranas plasmáticas. O sistema de transporte de Na^+–K^+ bombeia o Na^+ para fora da célula e o K^+ para dentro ao hidrolisar o ATP no lado intracelular da membrana.

12.6 As células eucarióticas contêm compartimentos delimitados por membranas internas

Até o momento, consideramos apenas a membrana plasmática das células. Algumas bactérias e *archaea* apresentam essa membrana, circundada por uma parede celular. Outras bactérias, como *E. coli*, têm duas membranas separadas por uma parede celular (constituída de proteínas, peptídios e carboidratos) situada entre elas (Figura 12.35). A membrana interna atua como barreira de permeabilidade, enquanto a membrana externa e a parede celular proporcionam uma proteção adicional. A membrana externa é muito permeável às pequenas moléculas, em virtude da presença de porinas. A região situada entre as duas membranas que contém a parede celular é denominada *periplasma*.

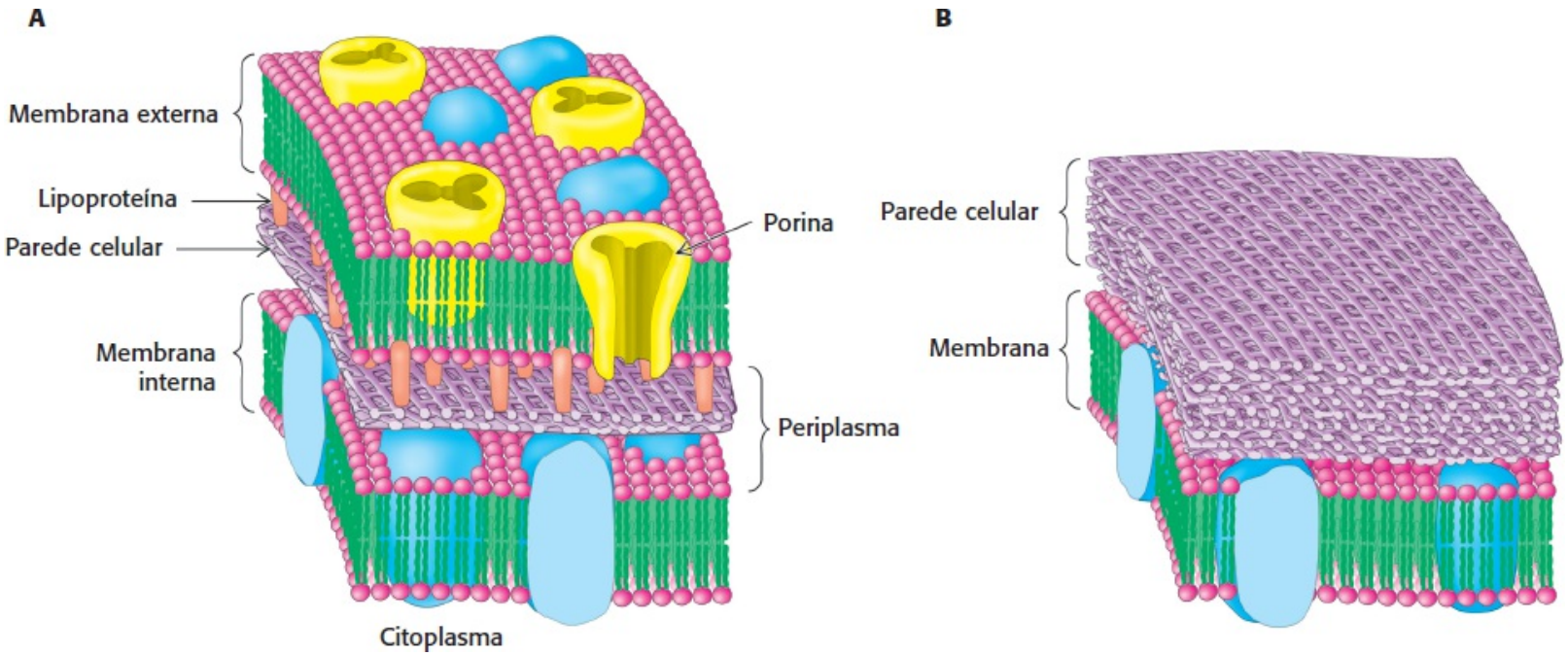


Figura 12.35 Membranas celulares de procariotas. Vista esquemática da membrana de células bacterianas circundadas

por (**A**) duas membranas ou (**B**) uma membrana.

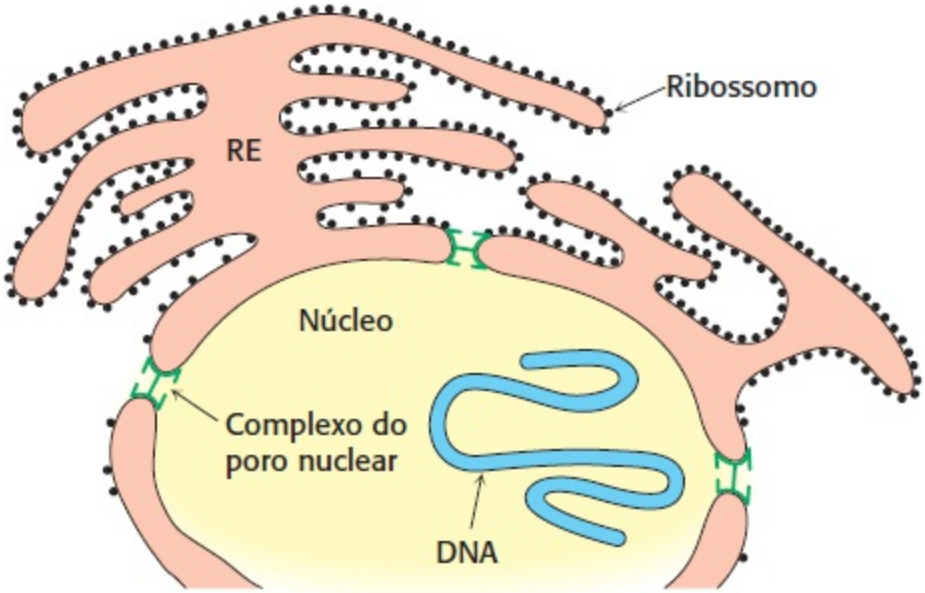


Figura 12.36 Envelope nuclear. O envelope nuclear é uma dupla membrana conectada a outro sistema de membranas dos eucariotos, o retículo endoplasmático. [De E. C. Schirmer e L. Gerace. *Genome Biol.* 3(4): 1008. 1–1008.4, 2002, reviews, Fig.1.]

Com exceção das células vegetais, as células eucarióticas não apresentam paredes celulares, e suas membranas celulares consistem em uma única bicamada lipídica. Nas células vegetais, a parede celular encontra-se no lado externo da membrana plasmática. As células eucarióticas diferenciam-se das células procarióticas pela presença de membranas dentro da célula que formam compartimentos internos. Por exemplo, os peroxissomos, que são organelas que desempenham um importante papel na oxidação dos ácidos graxos para a conversão da energia, são definidos por uma membrana única. As mitocôndrias, que são organelas nas quais ocorrem a síntese de ATP, são circundadas por duas membranas. Como no caso das bactérias, a membrana externa é muito permeável às pequenas moléculas, mas não a sua membrana interna. Com efeito, atualmente, há fortes evidências de que as mitocôndrias evoluíram a partir das bactérias por *endossimbiose* (Seção 18.1). O núcleo também é circundado por uma dupla membrana, o *envelope nuclear*, que consiste em um conjunto de membranas fechadas que se reúnem em estruturas denominadas *poros nucleares* (Figura 12.36). Esses poros regulam o transporte para dentro e para fora do núcleo. O envelope nuclear está ligado a outra estrutura definida por membranas, o *retículo endoplasmático*, que desempenha inúmeras funções celulares, incluindo desintoxicação de substâncias e modificação de proteínas para secreção. Por conseguinte, uma célula eucariótica contém compartimentos que interagem, e o transporte para dentro e para fora desses compartimentos é essencial para muitos processos bioquímicos.

As membranas devem ser capazes de se separar ou de se unir, de modo que as células e os compartimentos possam captar, transportar e liberar moléculas. Muitas células captam moléculas pelo processo de *endocitose mediada por receptor*. Neste caso, uma proteína ou um complexo maior liga-se inicialmente a um receptor existente na superfície da célula. Após a ligação ao receptor, proteínas especializadas atuam para induzir a invaginação da membrana nessa região. Uma dessas proteínas especializadas é a *clatrina*, que se polimeriza em uma rede em torno do broto da membrana em crescimento, frequentemente designado como *depressão revestida por* clatrina (Figura 12.37). A membrana invaginada acaba se rompendo e funde-se, dando origem a uma *vesícula*. Diversos

hormônios, proteínas transportadoras e anticorpos utilizam a endocitose mediada por receptor para entrar nas células. Uma consequência menos vantajosa é o fato de que essa via está disponível para vírus e toxinas como meio de entrada nas células. O processo inverso – a fusão de uma vesícula com uma membrana – constitui uma etapa essencial na liberação de neurotransmissores de um neurônio na fenda sináptica (Figura 12.38).

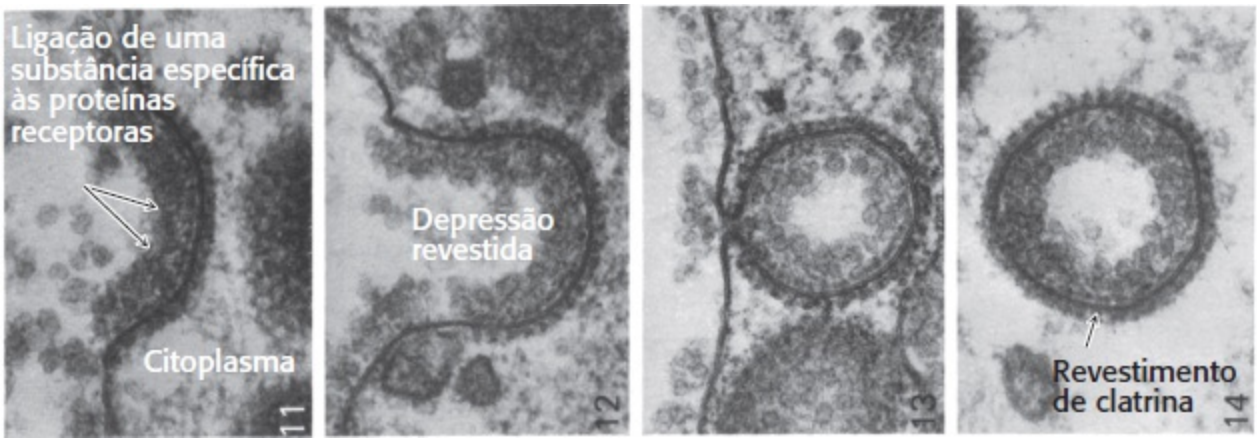


Figura 12.37 Formação de vesícula por endocitose mediada por receptor. A ligação de um ligante ao seu receptor na superfície da célula induz à invaginação da membrana, com o auxílio de proteínas intracelulares especializadas, como a clatrina. O processo resulta na formação de uma vesícula dentro da célula. [M.M. Perry A. B. Gilbert. J. Cell Sci. 39:266, 1979.]

Figura 12.38 Liberação de neurotransmissor. Vesículas sinápticas contendo neurotransmissores estão dispostas perto da membrana plasmática de uma célula nervosa. As vesículas sinápticas fundem-se com a membrana plasmática, liberando neurotransmissor na fenda sináptica. [T. Reese/Don Fawcett/Photo Researchers.]

Consideremos um exemplo de endocitose mediada por receptor. O ferro é um elemento essencial para a função e a estrutura de muitas proteínas, incluindo a hemoglobina e a mioglobina (Capítulo 7). Entretanto, os íons de ferro livres são altamente tóxicos para as células, pois eles têm a capacidade de catalisar a formação de radicais livres. Por conseguinte, o transporte de átomos de ferro do trato digestivo para as células, onde são mais necessários, precisa ser rigorosamente controlado. Na corrente sanguínea, o ferro está estreitamente ligado à proteína *transferrina*, que tem a capacidade de ligar dois íons Fe^{3+} com uma constante de dissociação de 10^{-23} M em pH neutro. As células que necessitam de ferro expressam o *receptor de transferrina* em suas membranas plasmáticas (Seção 32.4). A formação de um complexo entre o receptor de transferrina e a transferrina ligada ao ferro dá início ao processo de endocitose mediada por receptor, internalizando os complexos dentro de

vesículas denominadas endossomos (Figura 12.39). À medida que os endossomos amadurecem, bombas de prótons dentro da membrana da vesícula reduzem o pH luminal para cerca de 5,5. Nessas condições, a afinidade dos íons de ferro pela transferrina diminui; em consequência, esses íons são liberados e atravessam os canais das membranas endossômicas, passando para o citoplasma. O complexo de transferrina sem ferro é reciclado para a membrana plasmática, onde a transferrina é liberada de volta à corrente sanguínea, podendo o receptor de transferrina participar de outro ciclo de captação.

Embora o brotamento e a fusão pareçam ser enganosamente simples, as estruturas dos intermediários nesses processos e os mecanismos detalhados continuam sendo áreas ativas de pesquisa. Componentes essenciais da membrana, denominados proteínas SNARE (receptor de proteína de ligação de fator sensível à *N*-etilmaleimida solúvel, do inglês *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*), ajudam a reunir membranas apropriadas para dar início ao processo de fusão. Essas proteínas, codificadas por famílias de genes em todas as células eucarióticas, determinam, em grande parte, o compartimento com o qual uma vesícula irá se fundir. A especificidade de fusão das membranas assegura o tráfego ordenado das vesículas de membrana e suas cargas através das células eucarióticas.

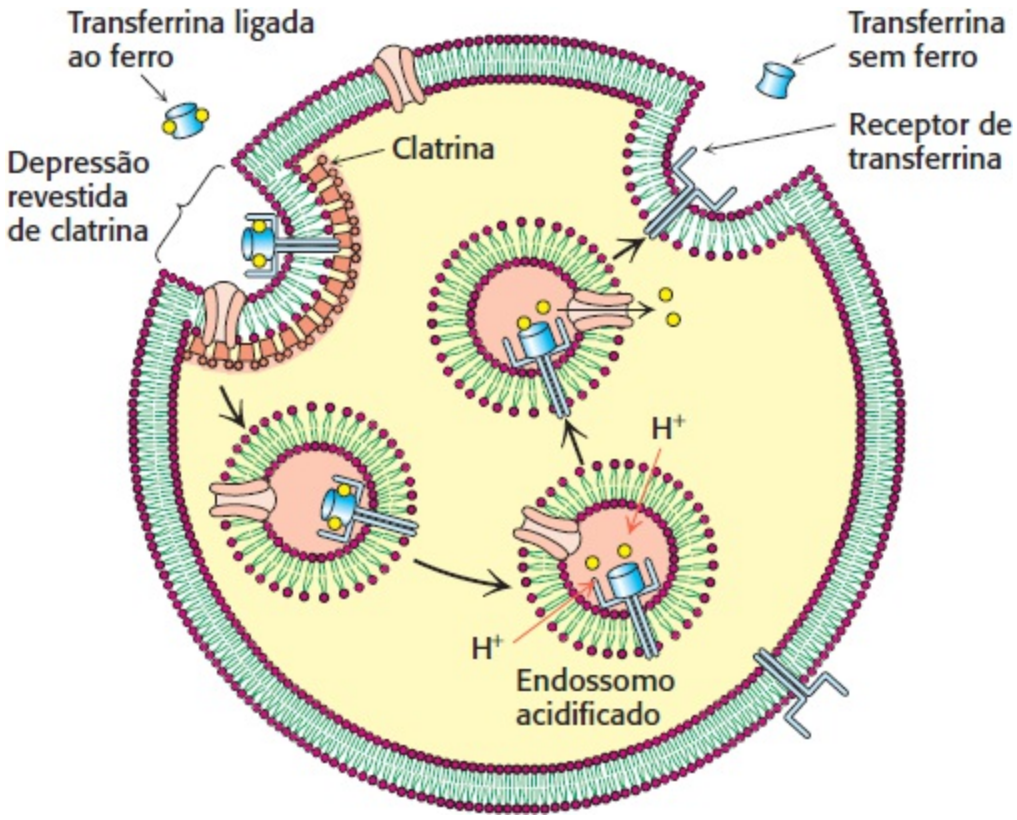


Figura 12.39 Ciclo do receptor de transferrina. A transferrina ligada ao ferro liga-se ao receptor de transferrina (TfR) na superfície das células. Ocorre endocitose mediada pelo receptor, levando à formação de uma vesícula, denominada endossomo. À medida que o lúmen do endossomo é acidificado pela ação das bombas de prótons, o ferro é liberado da transferrina, atravessa os canais da membrana e é utilizado pela célula. O complexo entre transferrina sem ferro e o receptor de transferrina retorna à membrana plasmática para outro ciclo. [De L. Zecca *et al. Nat. Rev. Neurosci*. 5:863-873, 2004, Fig. 1.]

Resumo

As membranas biológicas são estruturas laminares, tipicamente, de 60 a 100 Å de espessura, compostas de moléculas de proteínas e lipídios mantidas juntas por interações não covalentes. As membranas são barreiras de permeabilidade altamente seletivas. Criam compartimentos fechados, que podem ser células inteiras ou organelas dentro de uma célula. As proteínas nas membranas regulam as composições moleculares e iônicas desses compartimentos. As membranas também controlam o fluxo de informação entre as células.

12.1 Os ácidos graxos são constituintes essenciais dos lipídios

Os ácidos graxos são cadeias hidrocarbonadas de vários comprimentos e graus de insaturação, que terminam com um grupo de ácido carboxílico. As cadeias de ácidos graxos nas membranas contêm, habitualmente, entre 14 e 24 átomos de carbono e podem ser saturadas ou insaturadas. As cadeias curtas e a insaturação aumentam a fluidez dos ácidos graxos e seus derivados, diminuindo a temperatura de fusão.

12.2 Existem três tipos comuns de lipídios de membrana

Os principais tipos de lipídios de membranas são os fosfolipídios, os glicolipídios e o colesterol. Os fosfoglicerídios, um tipo de fosfolipídio, são constituídos de um arcabouço de glicerol, duas cadeias de ácidos graxos e um álcool fosforilado. A fosfatidilcolina, a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina são os principais fosfoglicerídios. A esfingomielina, um tipo diferente de fosfolipídio, contém um arcabouço de esfingosina em lugar de glicerol. Os glicolipídios são lipídios que contêm açúcares, derivados da esfingosina. O colesterol, que modula a fluidez da membrana, é formado a partir de um núcleo esteroide. Uma característica comum desses lipídios de membrana é que são moléculas anfipáticas, apresentando uma extremidade hidrofóbica e outra hidrofílica.

12.3 Os fosfolipídios e os glicolipídios formam prontamente lâminas bimoleculares em meios aquosos

Os lipídios de membrana formam espontaneamente lâminas bimoleculares extensas em soluções aquosas. A força motriz para a formação das membranas é proporcionada pelas interações hidrofóbicas entre as caudas de ácidos graxos dos lipídios de membrana. As cabeças hidrofílicas interagem com o meio aquoso. As bicamadas lipídicas são estruturas cooperativas, mantidas unidas por numerosas ligações fracas. Essas bicamadas lipídicas são altamente impermeáveis aos íons e à maioria das moléculas polares. Todavia, são muito fluidas, o que possibilita a sua atuação como solvente para as proteínas de membrana.

12.4 As proteínas realizam a maior parte dos processos da membrana

Proteínas específicas medeiam funções distintas da membrana, como transporte, comunicação e transdução de energia. Muitas proteínas integrais de membrana atravessam a bicamada lipídica de um lado ao outro, enquanto outras são apenas parcialmente inseridas na membrana. As proteínas periféricas de membrana estão ligadas às superfícies das membranas por interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio. As proteínas transmembranares apresentam estruturas regulares, incluindo fitas β, embora a α-hélice seja a estrutura transmembranar mais comum. Sequências de 20 aminoácidos apolares consecutivos podem ser diagnósticas como uma região

de α-hélice transmembranar de uma proteína.

12.5 Os lipídios e muitas proteínas de membrana difundem-se rapidamente no plano da membrana

As membranas são estrutural e funcionalmente assimétricas, conforme exemplificado pela restrição de resíduos de açúcar à superfície externa das membranas plasmáticas dos mamíferos. As membranas são estruturas dinâmicas, em que as proteínas e os lipídios se difundem rapidamente no plano da membrana (difusão lateral), a não ser que sejam restritos por interações especiais. Em contrapartida, a rotação de lipídios de uma face de uma membrana para outra (difusão transversa ou *flip-flop*) é, habitualmente, muito lenta. As proteínas não rotacionam através de bicamadas; dessa maneira, a assimetria da membrana pode ser preservada. O grau de fluidez de uma membrana depende do comprimento da cadeia de seus lipídios e do grau de insaturação de seus ácidos graxos constituintes. Nos animais, o conteúdo de colesterol também regula a fluidez da membrana.

12.6 As células eucarióticas contêm compartimentos delimitados por membranas internas

Uma série extensa de membranas internas nos eucariotos cria compartimentos dentro de uma célula para desempenhar funções bioquímicas distintas. Por exemplo, uma dupla membrana circunda o núcleo, o local da maior parte do material genético da célula, bem como as mitocôndrias, o local da maior parte da síntese de ATP. Uma única membrana define os outros compartimentos internos, como o retículo endoplasmático. A endocitose mediada por receptor possibilita a formação de vesículas intracelulares, quando ligantes se ligam às suas proteínas receptoras correspondentes na membrana plasmática. O processo inverso – a fusão de uma vesícula a uma membrana – constitui uma etapa essencial na liberação de moléculas de sinalização para fora da célula.

Palavras-chave

ácido graxo (p. 348)
balsa lipídica (*lipid raft)* (p. 365)
bicamada lipídica (p. 354)
cerebrosídio (p. 352)
clatrina (p. 367)
colesterol (p. 352)
difusão lateral (p. 361)
endocitose mediada por receptor (p. 367)
endossomo (p. 368)
esfingomielina (p. 351)
esfingosina (p. 350)
fosfoglicerídio (p. 350)
fosfolipídio (p. 350)
gangliosídio (p. 352)
glicolipídio (p. 350)
gráfico de hidropatia (p. 362)
lipossomo (p. 355)

modelo do mosaico fluido (p. 364)
molécula anfipática (anfifílica) (p. 353)
proteína integral de membrana (p. 357)
proteína periférica de membrana (p. 358)
proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*) (p. 368)
receptor de transferrina (p. 368)
transferrina (p. 368)

Questões

1. *Densidade de população*. Quantas moléculas de fosfolipídios existem em uma região de 1 μm^2 de uma membrana com bicamada de fosfolipídio? Suponha que uma molécula de fosfolipídio ocupe 70 $Å^2$ da área de superfície.

2. *Através do espelho.* Os fosfolipídios formam bicamadas lipídicas na água. Qual a estrutura que poderia se formar se os fosfolipídios fossem colocados em um solvente orgânico?

3. *Difusão de lipídios*. Qual é a distância média percorrida por um lipídio de membrana em 1 μs, 1 ms e 1 s? Suponha um coeficiente de difusão de 10^{-8} cm^2 s^{-1}.

4. *Difusão de proteínas*. O coeficiente de difusão, *D*, de uma molécula esférica rígida é fornecido por

$$D = kT/6\pi\eta r$$

em que é a viscosidade do solvente, *r*, o raio da esfera, *k* a constante de Boltzman ($1{,}38 \times 10^{-16}$ erg $grau^{-1}$), e *T,* a temperatura absoluta. Qual é o coeficiente de difusão a 37°C de uma proteína de 100 kDa em uma membrana com viscosidade efetiva de 1 poise (1 poise = 1 erg s^{-1} cm^{-3})? Qual a distância média percorrida por essa proteína em 1 μs, 1 ms e 1 s? Suponha que essa proteína seja uma esfera rígida não hidratada com densidade de 1,35 g cm^{-3}.

5. *Sensibilidade ao frio*. Alguns antibióticos atuam como transportadores, que se ligam a um íon em um lado da membrana, difundem-se através da membrana e liberam o íon do outro lado. A condutância de uma membrana de bicamada lipídica contendo um antibiótico carreador diminuiu abruptamente quando a temperatura foi reduzida de 40°C para 36°C. Por outro lado, houve pouca mudança na condutância da mesma membrana de bicamada quando continha um antibiótico formador de canais. Por quê?

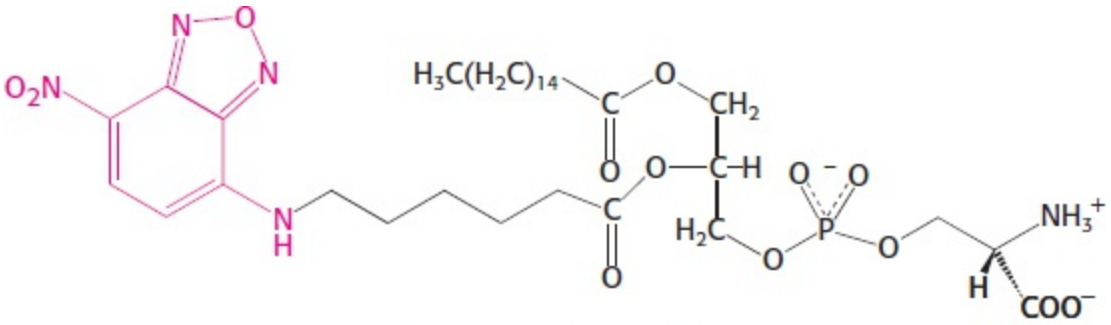
6. *Ponto de fusão 1.* Explique por que o ácido oleico (18 carbonos, uma ligação cis) tem menor ponto de fusão do que o ácido esteárico, que tem o mesmo número de ácidos de carbono, porém é saturado? Como você espera que seja o ponto de fusão do ácido t*rans*-oleico em comparação com o do ácido *cis*-oleico? Por que a maioria dos ácidos graxos insaturados nos fosfolipídios poderia estar na conformação cis, em lugar da conformação trans?

7. *Ponto de fusão 2*. Explique por que o ponto de fusão do ácido palmítico (C_{16}) é 6,5° mais baixo que o do ácido esteárico (C_{18}).

8. *Uma dieta saudável.* Pequenos mamíferos hibernantes podem suportar temperaturas corporais de 0° a 5°C sem qualquer dano. Entretanto, as gorduras corporais da maioria dos mamíferos apresentam

temperaturas de fusão de aproximadamente 25°C. Como a composição da gordura corporal dos animais hibernantes pode previsivelmente diferir daquela de seus primos não hibernantes?

9. *Flip-flop 1.* A difusão transversa de fosfolipídios em uma membrana em bicamada foi investigada com o uso de um análogo da fosfatidilserina, denominado NBD-PS marcado com fluorescência.



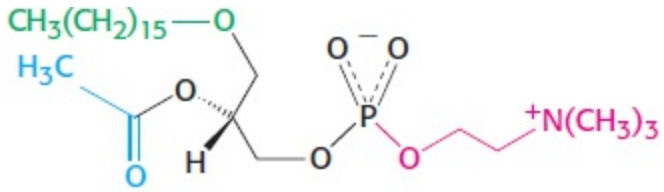
NBD-fosfatidilserina (NBD-PS)

O sinal de fluorescência da NBD-PS é extinto quando exposta à ditionita de sódio, um agente redutor ao qual a membrana não é permeável.

Vesículas lipídicas contendo fosfatidilserina (98%) e NBDPS (2%) foram preparadas por sonicação e purificadas. Dentro de poucos minutos após a adição de ditionita de sódio, o sinal de fluorescência dessas vesículas diminuiu para cerca de 45% do seu valor inicial. A adição imediata de uma segunda alíquota de ditionita de sódio não produziu nenhuma mudança no sinal de fluorescência. Entretanto, quando as vesículas foram incubadas por 6,5 h, a adição de uma terceira alíquota de ditionita de sódio diminuiu o sinal de fluorescência remanescente em 50%. Como você interpretaria as mudanças de fluorescência com cada adição de ditionita de sódio?

10. *Flip-flop 2.* Embora as proteínas raramente, ou nunca, sofram *flip-flop* através de uma membrana, a distribuição dos lipídios de membrana dentre seus folhetos não é absoluta, exceto no caso dos glicolipídios. Por que os lipídios glicosilados têm menos tendência a sofrer *flip-flop*?

11. *Ligações.* O fator de ativação plaquetário (PAF) é um fosfolipídio que desempenha um papel nas respostas alérgicas e inflamatórias, bem como na síndrome do choque tóxico. A estrutura do PAF é mostrada aqui. Como ela difere das estruturas dos fosfolipídios discutidos neste capítulo?



Fator de ativação plaquetário (PAF)

12. *Uma questão de competição*. Um homopolímero de alanina tem mais probabilidade de formar uma α-hélice na água ou em um meio hidrofóbico? Explique.

13. *Falso-positivo*. A análise do gráfico de hidropatia de sua proteína de interesse revela um único pico hidrofóbico proeminente. Entretanto, você descobre posteriormente que essa proteína é solúvel e não está associada à membrana. Explique como o gráfico de hidropatia pode ter sido enganoso.

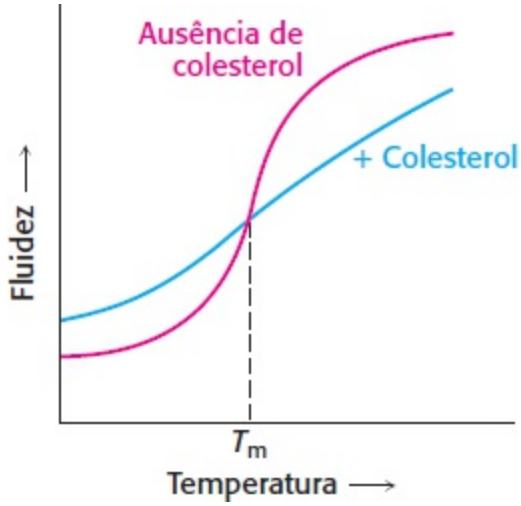
14. *Mantendo a fluidez.* Uma cultura de bactérias crescendo a 37°C teve a sua temperatura reduzida

a 25°C. Como você esperaria que essa mudança fosse alterar a composição de ácidos graxos dos fosfolipídios de membrana? Explique.

15. *De quantas maneiras.* Cada fusão intracelular de uma vesícula com uma membrana necessita de uma proteína SNARE na vesícula (denominada v-SNARE) e de uma proteína SNARE na membrana-alvo (denominada t-SNARE). Suponha que um genoma codifique 21 membros da família v-SNARE e 7 membros da família t-SNARE. Com a suposição de ausência de especificidade, quantas interações potenciais de v-SNARE com t-SNARE podem ocorrer?

Questões Interpretação de dados

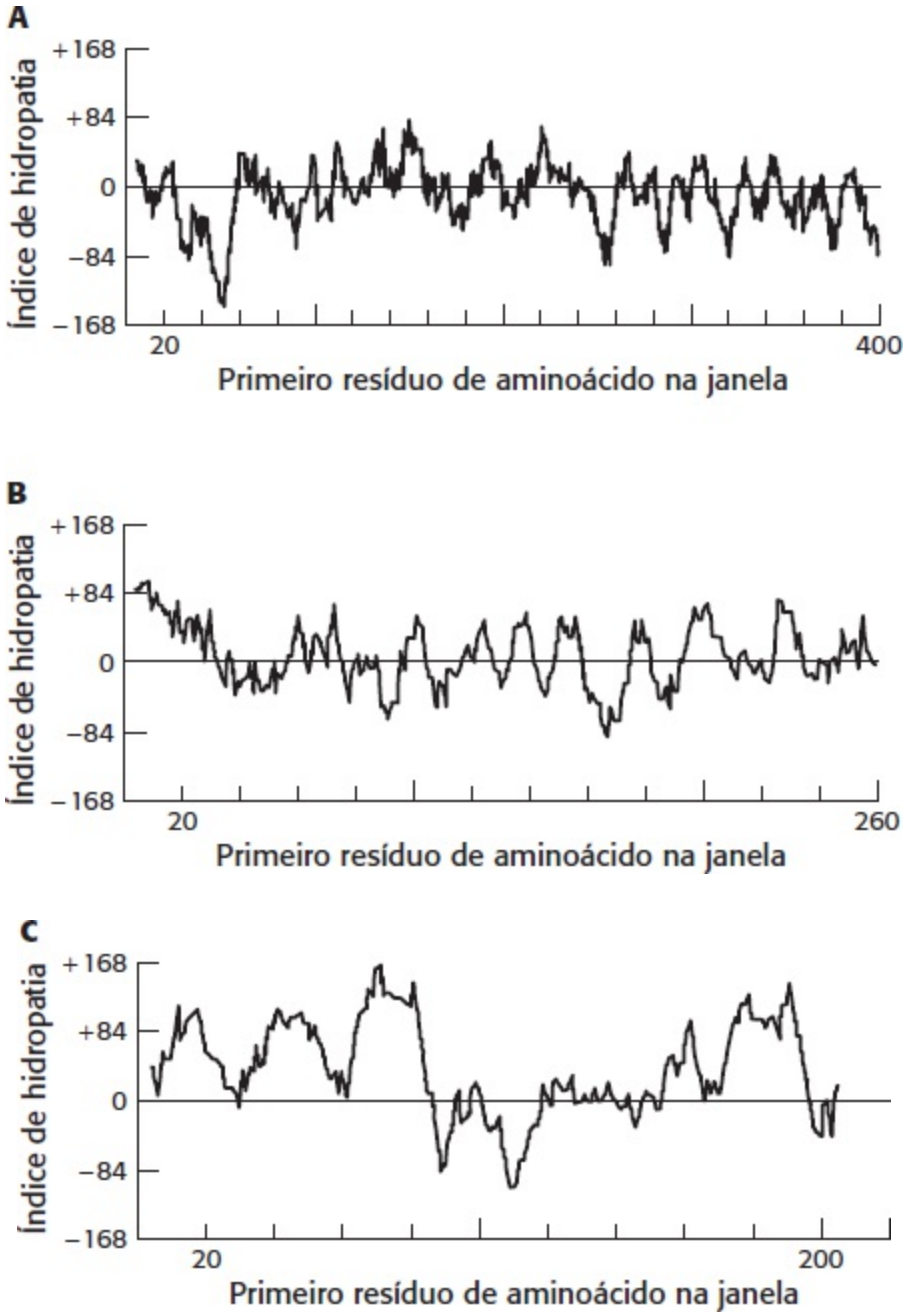
16. *Efeitos do colesterol.* A curva vermelha no gráfico seguinte mostra a fluidez dos ácidos graxos de uma bicamada fosfolipídica em função da temperatura. A curva azul mostra a fluidez na presença de colesterol.



(a) Qual é o efeito do colesterol?

(b) Por que esse efeito seria importante em termos biológicos?

17. *Gráficos de hidropatia.* Com base nos seguintes gráficos de hidropatia para três proteínas (A a C), preveja quais seriam as proteínas de membrana. Quais são as ambiguidades quanto ao uso desses gráficos para determinar se uma proteína é de membrana?

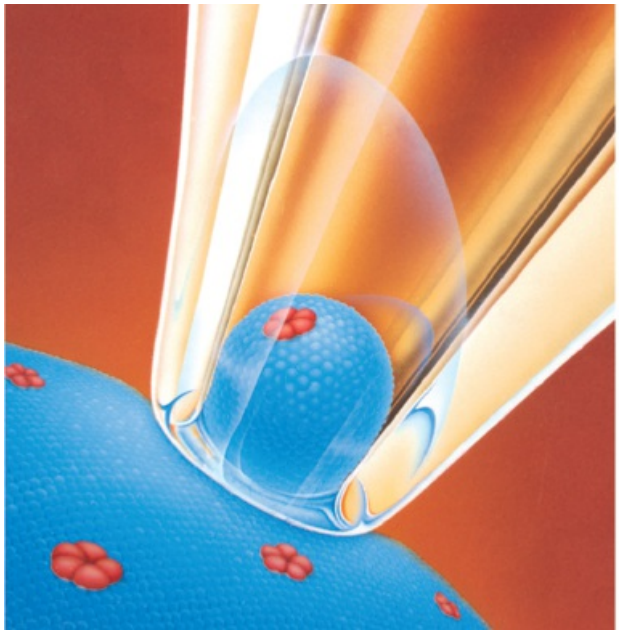


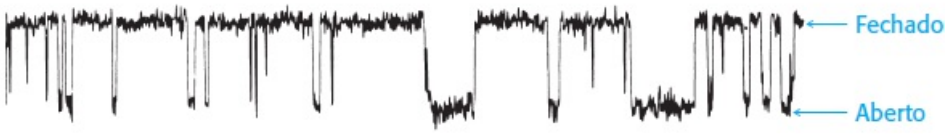
Questão | Integração de capítulos

18. *Ambiente apropriado*. O conhecimento da estrutura e da função das proteínas de membrana ficou atrasado em relação ao de outras proteínas.O principal motivo é que as proteínas de membranas são mais difíceis de purificar e de cristalizar. Por que isso acontece?

Canais e Bombas de Membranas

13





O fluxo de íons através de um único canal de membrana (os canais estão mostrados em vermelho na ilustração à esquerda) pode ser detectado pela técnica de fixação de placa (*patch-clamp*), que registra mudanças de corrente quando o canal oscila entre os estados aberto e fechado. [(À esquerda) De E. Neher and B. Sakmann. The patch clamp technique. Copyright © 1992 by Scientific American, Inc. Todos os direitos reservados. (À direita) Cortesia do Dr. Mauricio Montal.]

SUMÁRIO

13.1 O transporte de moléculas através de uma membrana pode ser ativo ou passivo

13.2 Duas famílias de proteínas de membrana utilizam a hidrólise do ATP para bombear íons e moléculas através das membranas

13.3 13.3 A lactose permease é um protótipo dos transportadores secundários utilizam um gradiente de concentração para abastecer o próximo

13.4 13.4 Canais específicos podem rapidamente transportar íons através das membranas

13.5 As junções comunicantes (*gap junctions*) possibilitam o fluxo de íons e pequenas moléculas entre células que se comunicam

13.6 Canais específicos aumentam a permeabilidade de algumas membranas à água

A bicamada lipídica das membranas biológicas é intrinsecamente impermeável aos íons e às moléculas polares; mesmo assim, algumas dessas espécies devem ser capazes de atravessar essas membranas para a função normal das células. A permeabilidade é conferida por três classes de proteínas de membranas: as *bombas*, os *carreadores* e os *canais*. As bombas utilizam uma fonte de energia livre, como a hidrólise do ATP ou a absorção de luz, para acionar o transporte termodinamicamente desfavorável de íons ou moléculas. A ação das bombas fornece um exemplo de *transporte ativo*. Os carreadores medeiam o transporte de íons e pequenas moléculas através de

membranas sem o consumo de ATP. Os canais formam um poro na membrana através do qual os íons podem fluir rapidamente em uma direção termodinamicamente favorável. A ação dos canais ilustra o *transporte passivo* ou *difusão facilitada*.

As bombas são transdutores de energia, que convertem uma forma de energia livre em outra. Dois tipos de *bombas acionadas pelo ATP*, as ATPa-ses do tipo P e os transportadores com cassete de ligação de ATP (ABC), sofrem mudanças de conformação com a ligação e a hidrólise do ATP, proporcionando o transporte de um íon ligado através da membrana. A energia livre da hidrólise do ATP é usada para impulsionar o movimento de íons contra seus gradientes de concentração, um processo denominado *transporte ativo primário*. Em contrapartida, os carreadores utilizam o gradiente de um íon para impulsionar o transporte de outro contra o seu gradiente. Um exemplo desse processo, denominado *transporte ativo secundário*, é mediado pelo transportador de lactose de *E. coli*, uma proteína bem estudada, responsável pela captação de um açúcar específico do ambiente de uma bactéria. Muitos transportadores dessa classe são encontrados nas membranas de nossas células. A expressão desses transportadores determina os metabólitos que uma célula pode importar do ambiente. Por conseguinte, o ajuste do nível de expressão dos transportadores constitui um mecanismo primário de controle do metabolismo.

As bombas podem estabelecer gradientes persistentes de determinados íons através das membranas. *Canais iônicos* específicos possibilitam o fluxo rápido desses íons através das membranas, ao longo dos gradientes. Esses canais estão entre as moléculas mais fascinantes da bioquímica pela sua capacidade de propiciar o fluxo livre de alguns íons através de uma membrana, enquanto bloqueiam o fluxo de espécies até mesmo estreitamente relacionadas. A abertura ou regulagem desses canais pode ser controlada pela presença de certos ligantes ou por determinada voltagem da membrana. Os canais iônicos regulados são fundamentais para o funcionamento de nosso sistema nervoso, atuando como disjuntores elaborados que possibilitam o rápido fluxo de corrente.

Por fim, uma classe diferente de canal, o canal de célula para célula ou junção comunicante (*gap junction*), possibilita o fluxo de metabólitos ou íons *entre as células*. Por exemplo, as junções comunicantes são responsáveis pela sincronização da contração das células musculares no batimento cardíaco.

A expressão de transportadores define, em grande parte, as atividades metabólicas de determinado tipo celular

Cada tipo celular expressa um conjunto específico de transportadores em sua membrana plasmática. Esse conjunto de transportadores expressos é importante, visto que determina, em grande parte, a composição iônica no interior das células e os compostos que podem ser captados a partir do ambiente celular. De certo modo, o conjunto de transportadores específicos de uma célula define as suas características, já que uma célula só pode executar as reações bioquímicas para as quais captou os substratos necessários.

Um exemplo tomado do metabolismo da glicose ilustra esse aspecto. Como veremos na discussão do metabolismo da glicose no Capítulo 16, os tecidos diferem na sua capacidade de empregar diferentes moléculas como fontes de energia. Os tipos de tecidos que podem utilizar a glicose são determinados, em grande parte, pela expressão de diferentes membros de uma família de transportadores homólogos de glicose, denominados GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4 e GLUT5.

Por exemplo, o GLUT3 só é expresso nos neurônios e em outros poucos tipos celulares. Esse transportador liga-se de maneira relativamente firme à glicose, de modo que essas células têm prioridade para a glicose quando esta está presente em concentrações relativamente baixas. Este é apenas o primeiro de muitos exemplos que encontraremos para demonstrar o papel importante desempenhado pela expressão de transportadores no controle e na integração do metabolismo.

13.1 O transporte de moléculas através de uma membrana pode ser ativo ou passivo

Inicialmente, consideraremos alguns princípios gerais do transporte nas membranas. Dois fatores determinam se uma molécula irá atravessar uma membrana: (1) a permeabilidade da bicamada lipídica à molécula e (2) a disponibilidade de uma fonte de energia.

Muitas moléculas necessitam de proteínas transportadoras para atravessar as membranas

Conforme assinalado no Capítulo 12, algumas moléculas podem atravessar as membranas celulares em virtude de sua capacidade de se dissolver na bicamada lipídica. Essas moléculas são denominadas *moléculas lipofílicas*. Os hormônios esteroides fornecem um exemplo fisiológico. Esses parentes do colesterol podem atravessar uma membrana, porém o que determina o sentido no qual irão se mover? Essas moléculas podem atravessar uma membrana ao longo de um gradiente de concentração, em um processo denominado *difusão simples*. De acordo com a Segunda Lei da Termodinâmica, as moléculas movem-se espontaneamente de uma região de maior concentração para outra de menor concentração.

O assunto torna-se mais complicado quando a molécula é altamente polar. Por exemplo, tipicamente, em uma célula, os íons sódio estão presentes em uma concentração de 143 mM fora e em uma concentração 14 mM dentro da célula. Todavia, o sódio não penetra livremente na célula, visto que o íon dotado de carga é incapaz de passar pelo interior hidrofóbico da membrana. Em algumas circunstâncias, como durante um impulso nervoso, os íons sódio precisam penetrar na célula. Como são capazes de fazer isso? Os íons sódio atravessam canais específicos na barreira hidrofóbica formada pelas proteínas de membrana. Esse mecanismo de cruzar a membrana é denominado *difusão facilitada*, visto que a difusão através da membrana é facilitada através do canal. É também denominado *transporte passivo*, já que a energia que aciona o movimento dos íons origina-se do próprio gradiente iônico, sem qualquer contribuição pelo sistema de transporte. Os canais, do mesmo modo que as enzimas, exibem especificidade de substrato, pois eles facilitam o transporte de alguns íons, mas não de outros, mesmo que sejam íons estreitamente relacionados.

Como o gradiente de sódio é estabelecido em primeiro lugar? Nesse caso, o sódio precisa se mover ou ser bombeado *contra* um gradiente de concentração. Como o movimento do íon de uma região de baixa concentração para uma de maior concentração resulta em uma diminuição da entropia, isso exige uma entrada de energia livre. As proteínas transportadoras inseridas na membrana são capazes de utilizar uma fonte de energia para mover a molécula contra o gradiente de concentração. Como é necessária uma entrada de energia proveniente de outra fonte, esse mecanismo de atravessamento da membrana é denominado *transporte ativo*.

A energia livre armazenada em gradientes de concentração pode ser quantificada

Uma distribuição desigual de moléculas constitui uma condição rica em energia, visto que a energia livre é reduzida ao mínimo quando todas as concentrações ficam iguais. Em consequência, para alcançar essa distribuição desigual de moléculas, é necessária uma entrada (*input*) de energia livre. Como podemos quantificar a energia necessária para gerar um gradiente de concentração (Figura 13.1)? Consideremos uma molécula de soluto sem carga elétrica. A mudança de energia livre no transporte dessa espécie, do lado 1, onde está presente em uma concentração de c_1, para o lado 2, onde está presente em uma concentração c_2, é

$$\Delta G = RT \ln (c_2/c_1)$$

em que R é a constante de gases ($8{,}315 \times 10^{-3}$ kJ mol^{-1} deg^{-1} ou $1{,}987 \times 10^{-3}$ kcal mol^{-1} deg^{-1}) e T é a temperatura em kelvin. Para moléculas com carga elétrica, uma distribuição desigual através da membrana gera um potencial elétrico que também deve ser considerado, visto que os íons serão repelidos por cargas iguais. A soma dos termos de concentração e carga elétrica é denominada *potencial eletroquímico* ou *potencial de membrana*. A mudança de energia livre é então fornecida por

$$\Delta G = RT \ln (c_2/c_1) + ZF\Delta V$$

em que Z é a carga elétrica da espécie transportada, ΔV é o potencial em volts através da membrana e F é a constante de Faraday (96,5 kJ V^{-1} mol^{-1} ou 23,1 kcal V^{-1} mol^{-1}).

Um processo de transporte precisa ser ativo quando ΔG é positiva, enquanto pode ser passivo quando ΔG é negativa. Por exemplo, considere o transporte de uma molécula sem carga elétrica de $c_1 = 10^{-3}$ M para $c_2 = 10^{-1}$ M.

$$\begin{aligned}\Delta G &= RT \ln (10^{-1}/10^{-3}) \\ &= (8{,}315 \times 10^{-3}) \times 298 \times \ln (10^{-2}) \\ &= +\,11{,}4 \text{ kJ mol}^{-1)} + (2{,}7 \text{ kcal mol}^{-1})\end{aligned}$$

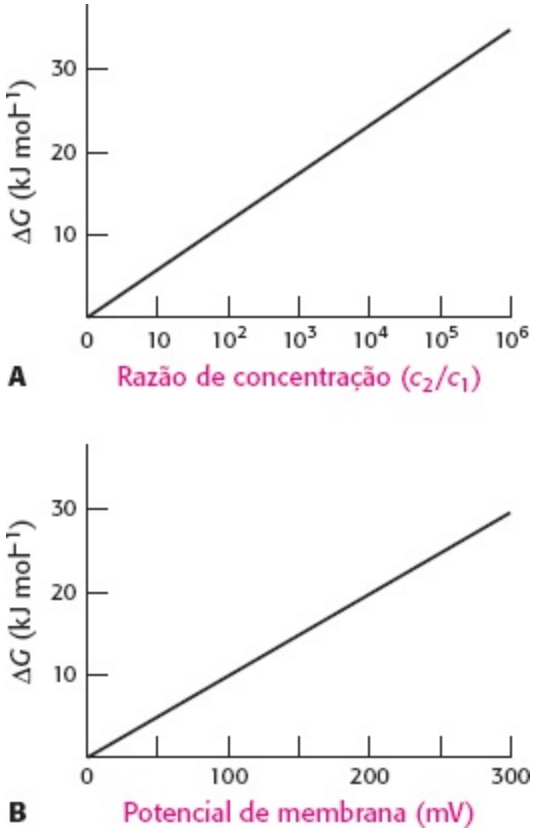


Figura 13.1 Energia livre e transporte. A mudança de energia livre no transporte (**A**) de um soluto sem carga elétrica de um compartimento com concentração c_1 para outro com concentração c_2 e (**B**) de uma espécie com carga elétrica única através de uma membrana para o lado que tem a mesma carga que o íon transportado. Observe que a variação de energia livre imposta por um potencial de membrana de 50 mV é equivalente àquela imposta por uma razão de concentração de 10 para um íon de carga elétrica simples a 25°C.

Na temperatura de 25°C (298 k), ΔG é de + 11,4 kJ mol^{-1} (+ 2,7 kcal $mol^{-1)}$, indicando que esse processo de transporte precisa de uma entrada de energia livre.

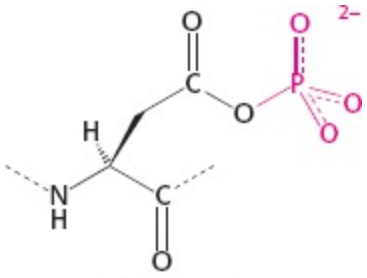
13.2 Duas famílias de proteínas de membrana utilizam a hidrólise do ATP para bombear íons e moléculas através das membranas

O fluido extracelular das células animais apresenta uma concentração salina semelhante à da água do mar. Entretanto, as células precisam controlar suas concentrações intracelulares de sais para facilitar processos específicos, como a transdução de sinais e a propagação de potenciais de ação, e para impedir interações desfavoráveis com altas concentrações de íons, como o Ca^{2+}. Por exemplo, a maioria das células animais contém alta concentração de K^+ e baixa concentração de Na^+ em relação ao meio externo. Esses gradientes iônicos são gerados por um sistema específico de transporte, uma enzima denominada *bomba* de Na^+–K^+ ou Na^+–K^+ ATPa-se. A hidrólise do ATP pela bomba fornece a energia necessária para o transporte ativo de Na^+ para fora da célula e de K^+ para dentro dela, gerando os gradientes. A bomba é denominada Na^+–K^+ ATPase, uma vez que a hidrólise do ATP só ocorre na presença de Na^+ e K^+. Essa ATPase, à semelhança de todas elas, necessita de Mg^{2+}.

A variação de energia livre que acompanha o transporte de Na^+ e K^+ pode ser calculada. Suponhamos que as concentrações de Na^+ fora e dentro da célula sejam de 143 e 14 mM, respectivamente, e que os valores correspondentes para o K^+ sejam de 4 e 157 mM. Em um potencial de membrana de –50 mV e uma temperatura de 37°C, podemos utilizar a equação da p. 375 para

determinar que a variação de energia livre para transportar 3 moles de Na^+ para fora da célula e 2 moles de K^+ para dentro é de 3(5,99) + 2(9,46) = +36,9 kJ mol^- (+8,8 kcal mol^{-1}). Nas condições de uma célula típica, a hidrólise de uma única molécula de ATP por ciclo de transporte fornece energia livre suficiente, de cerca de –50 kJ mol^{-1} (–12 kcal mol^{-1}), para acionar o transporte desses íons contra o gradiente de concentração. O transporte ativo de Na^+ e K^+ é de grande importância fisiológica. Com efeito, mais de um terço do ATP consumido por um animal em repouso é utilizado para bombear esses íons. O gradiente de Na^+–K^+ nas células animais controla o volume celular, torna os neurônios e as células musculares eletricamente excitáveis e aciona o transporte ativo dos açúcares e dos aminoácidos.

A purificação de outras bombas iônicas revelou uma grande família de bombas iônicas evolutivamente relacionadas, incluindo proteínas de bactérias de *archaea* e de todos os eucariotos. Cada uma dessas bombas é específica para determinado íon ou conjunto de íon. Duas dessas bombas são de interesse particular: a Ca^{2+} ATPase do *retículo sarcoplasmático* (ou SERCA), que transporta Ca^{2+} para fora do citoplasma e para dentro do retículo endoplasmático das células musculares, e a *H^+–K^+ ATPase* gástrica, a enzima responsável pelo bombeamento de prótons suficientes para dentro do estômago a fim de reduzir o pH a 1,0. Essas enzimas e as centenas de homólogas conhecidas, incluindo a Na^+–K^+ ATPase, são designadas como *ATPase do tipo P*, visto que elas formam um intermediário fosforilado essencial. Na formação desse intermediário, um grupo fosforila do ATP é ligado à cadeia lateral de um resíduo de aspartato específico conservado na ATPase para formar fosforilaspartato.



Fosforilaspartato

As ATPases do tipo P acoplam a fosforilação e mudanças conformacionais para bombear íons cálcio através das membranas

As bombas de membranas funcionam por mecanismos que, em princípio, são simples, mas que frequentemente são complexos nos seus detalhes. Fundamentalmente, cada proteína da bomba pode existir em dois estágios conformacionais principais, um com sítios de ligação a íons abertos para um lado da membrana e outro com sítios de ligação a íons abertos para o outro lado (Figura 13.2). Para bombear íons em uma única direção através de uma membrana, a energia livre da hidrólise do ATP precisa ser acoplada com a interconversão entre esses dois estados de conformação.

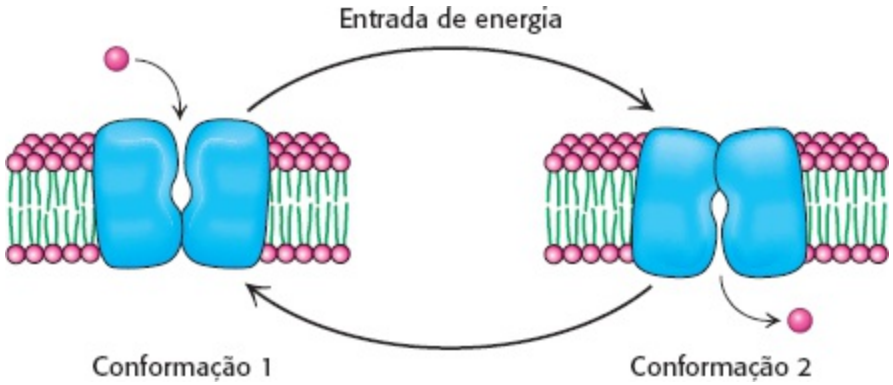


Figura 13.2 Ação da bomba. Esquema simples para o bombeamento de uma molécula através de uma membrana. A bomba sofre interconversão entre dois estados de conformação, cada um deles com um sítio de ligação acessível em um lado diferente da membrana.

Analisemos as características estruturais e de mecanismo das ATPases do tipo P tendo como base a SERCA. As propriedades dessa ATPase do tipo P foram estabelecidas em mais detalhes a partir das estruturas cristalinas da bomba em cinco estados diferentes. Essa enzima, que constitui 80% das proteínas da membrana do retículo sarcoplasmático, desempenha um importante papel no relaxamento do músculo contraído. A contração muscular é desencadeada por elevação abrupta do nível citoplasmático de íons cálcio. O relaxamento muscular subsequente depende da rápida remoção do Ca^{2+} do citoplasma pela SERCA para dentro do retículo sarcoplasmático, um compartimento especializado para o armazenamento de Ca^{2+}. Essa bomba mantém uma concentração de Ca^{2+} de aproximadamente 0,1 μM no citoplasma, em comparação com 1,5 mM no retículo sarcoplasmático.

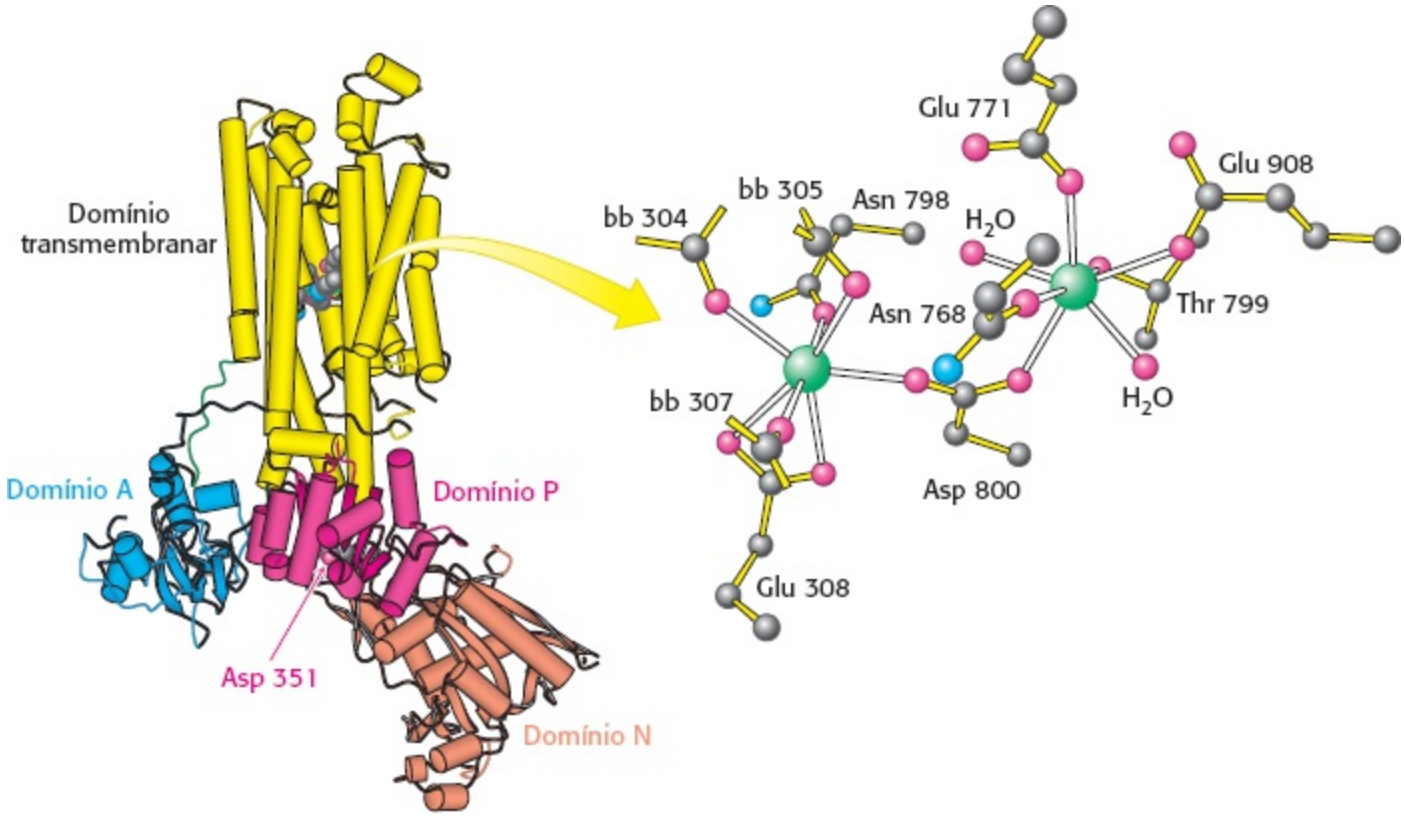


Figura 13.3 Estrutura da bomba de cálcio. A estrutura global da SERCA, uma ATPase do tipo P. *Observe* os dois íons cálcio (verde) situados no centro do domínios transmembranares. Um resíduo de aspartato conservado (Asp 351) que se liga a um grupo fosforila situase no domínio P. A designação bb refere-se a grupos carbonílicos do arcabouço. [Desenhada a partir de 1SU4.pdb.]

A primeira estrutura da SERCA a ser determinada apresentava Ca^{2+} ligado, porém sem nenhum nucleotídio presente (Figura 13.3). A SERCA é um polipeptídio simples de 110 kDa, com um domínio transmembranar constituído de 10 α-hélices. O domínio transmembranar inclui sítios para a ligação de dois íons cálcio. Cada íon cálcio é coordenado a sete átomos de oxigênio provenientes de uma combinação de resíduos de cadeias laterais de glutamato, aspartato, treonina e asparagina, grupos carbonila do arcabouço e moléculas de água. Uma grande cabeça citoplasmática corresponde a quase metade do peso molecular da proteína e é constituída de três domínios distintos, desempenhando, cada um deles, uma função distinta. Um domínio (N) liga-se ao *nucleotídio* ATP, outro (P) aceita o grupo fosforila (*p*hosphoryl) em um resíduo de aspartato conservado, e um terceiro (A) serve como *a*tuador, ligando as alterações nos domínios N e P à parte transmembranar da enzima.

A SERCA é notavelmente dinâmica na sua estrutura. Como exemplo, a estrutura da SERCA sem Ca^{2+} ligado e com um análogo de fosforilaspartato presente no domínio P é mostrada na Figura 13.4. Os domínios N e P estão fechados ao redor do análogo de fosforilaspartato, enquanto o domínio A sofreu rotação substancial em relação à sua posição na SERCA com Ca^{2+} ligado e sem o análogo fosforila. Além disso, a parte transmembranar da enzima sofreu um rearranjo substancial, e os sítios bem organizados de ligação ao Ca^{2+} foram rompidos (desfeitos). Esses sítios são agora acessíveis pelo lado da membrana oposto aos domínios N, P e A.

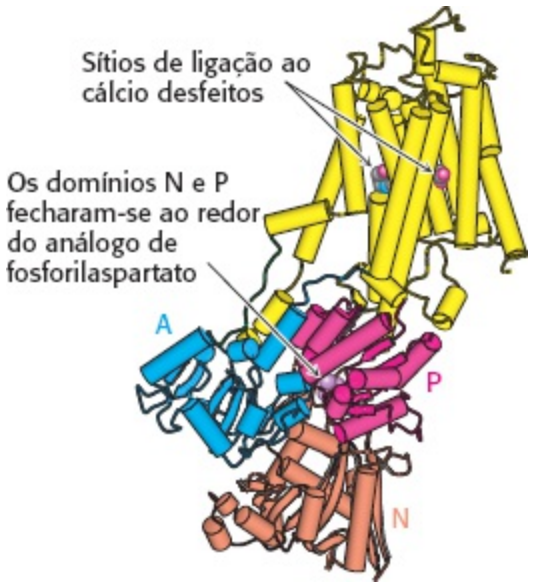


Figura 13.4 Mudanças conformacionais associadas ao bombeamento de cálcio. Essa estrutura foi determinada na ausência de cálcio ligado e na presença de um análogo de fosforilaspartato no domínio P. *Observe* o quão diferente essa estrutura é da forma ligada ao cálcio mostrada na Figura 13.3: tanto a parte transmembranar (amarelo) quanto os domínios A, P e N foram substancialmente rearranjados. [Desenhada a partir de 1WPG.pdb.]

Os resultados estruturais podem ser combinados com outros estudos para construir um mecanismo detalhado do bombeamento de Ca^{2+} pela SERCA (Figura 13.5).

1. O ciclo catalítico começa com a enzima em seu estado não fosforilado, com dois íons cálcio ligados. A conformação global da enzima nesse estado será designada como E_1; com o Ca^{2+} ligado, como E_1-$(Ca^{2+})_2$. Nessa conformação, a SERCA pode trocar íons cálcio, porém apenas com íon cálcio do lado citoplasmático da membrana. Essa conformação é apresentada na Figura 13.3.

2. Na conformação E_1, a enzima pode ligar-se ao ATP. Os domínios N, P e A sofrem um rearranjo

substancial, visto que se fecham ao redor do ATP ligado; entretanto, não há nenhuma mudança conformacional substancial do domínio transmembranar. Os íons cálcio estão agora retidos dentro da enzima.

3. O grupo fosforila é então transferido do ATP para Asp 351.

4. Com a liberação de ADP, a enzima novamente modifica a sua conformação global, incluindo, dessa vez, o domínio membranar. Essa nova conformação é designada como E_2 ou E_2-P em sua forma fosforilada. O processo de interconversão entre as conformações E_1 e E_2 é algumas vezes designado como *eversão*.

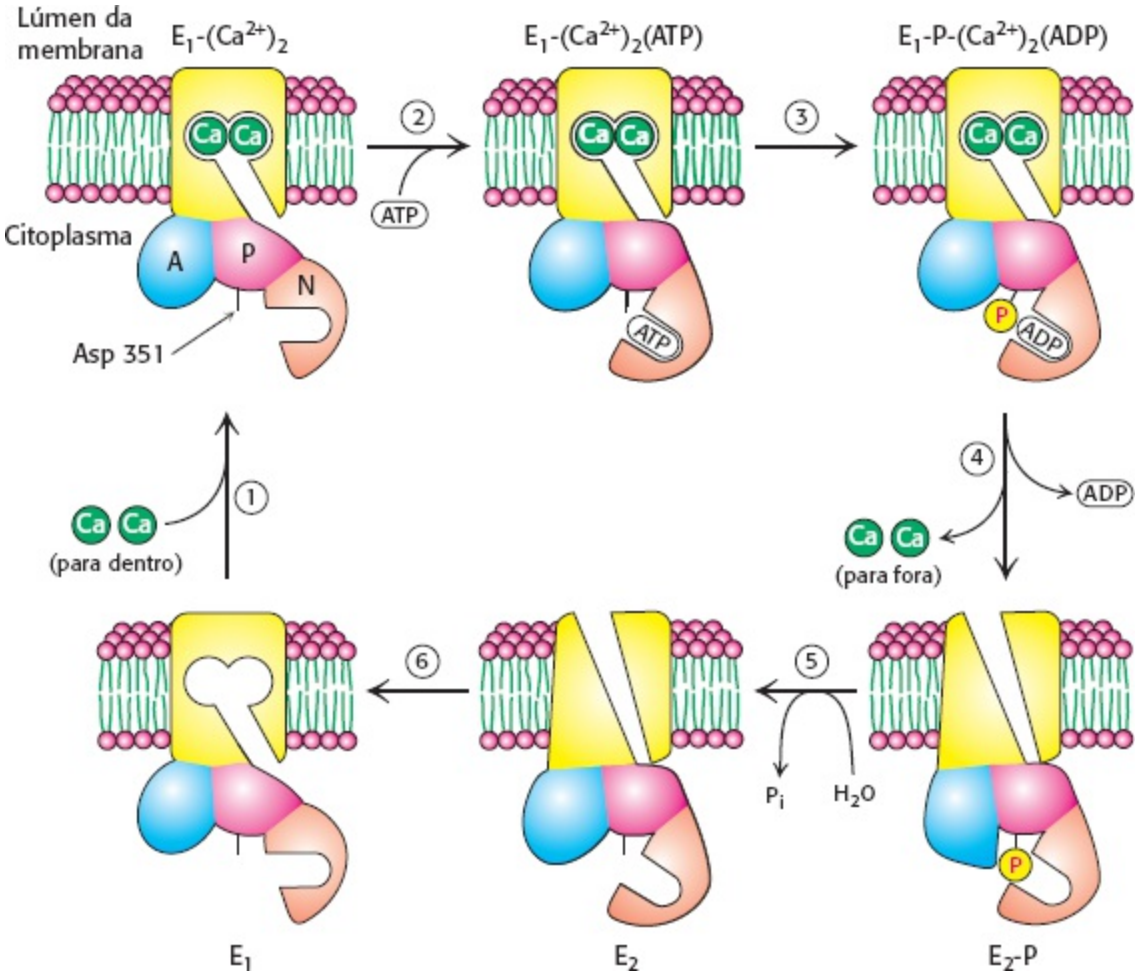


Figura 13.5 Bombeamento do cálcio. A Ca^{2+} ATPase transporta o Ca^{2+} através da membrana por um mecanismo que inclui (1) a ligação do Ca^{2+} a partir do citoplasma, (2) a ligação do ATP, (3) a clivagem do ATP com a transferência de um grupo fosforila para Asp 351 da enzima, (4) a liberação de ADP e a eversão da enzima para liberar Ca^{2+} no lado oposto da membrana, (5) a hidrólise do resíduo de fosforilaspartato e (6) a eversão para preparar para a ligação do Ca^{2+} a partir do citoplasma.

Na conformação E_2-P, os sítios de ligação ao Ca^{2+} sofrem ruptura, e os íons cálcio são liberados no lado da membrana oposto ao qual entraram; o transporte de íons foi, assim, realizado. Essa conformação é mostrada na Figura 13.4.

5. O resíduo de fosforilaspartato é hidrolisado, liberando fosfato inorgânico.

6. Com a liberação de fosfato, ocorre perda das interações que estabilizam a conformação E_2, e a

enzima retorna à conformação E_1.

A ligação de dois íons cálcio do lado citoplasmático da membrana completa o ciclo.

Esse mecanismo provavelmente se aplica a outras ATPases do tipo P. Por exemplo, a Na^+–K^+ ATPase é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$. Sua subunidade α é homóloga à SERCA e inclui um resíduo essencial de aspartato análogo ao Asp 351. A subunidade β não participa diretamente do transporte de íons. Existe um mecanismo análogo àquele mostrado na Figura 13.5, com ligação de três íons Na^+ do lado interno da célula à conformação E_1 e ligação de dois íons K^+ do lado de fora da célula à conformação E_2.

Os digitálicos inibem especificamente a bomba de Na^+–K^+ ao bloquearem a sua desfosforilação

Certos esteroides derivados de plantas são potentes inibidores ($K_i \approx 10$ nM) da bomba de Na^+–K^+. A digitoxigenina e a ouabaína são membros dessa classe de inibidores, que são conhecidos como *esteroides cardiotônicos*, em virtude de seus efeitos pronunciados sobre o coração (Figura 13.6). Esses compostos inibem a desfosforilação da forma E_2-P da ATPase quando aplicados na face *extracelular* da membrana.

A digitalina é uma mistura de esteroides cardiotônicos derivados da folha seca da dedaleira (*Digitalis purpurea*). O composto aumenta a força de contração do músculo cardíaco e, consequentemente, constitui um fármaco de escolha no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva. A inibição da bomba de Na^+–K^+ pelos digitálicos aumenta o nível de Na^+ dentro da célula. O gradiente diminuído de Na^+ resulta em extrusão mais lenta de Ca^{2+} pelo trocador de sódio-cálcio. A elevação subsequente nos níveis intracelulares de Ca^{2+} aumenta a capacidade de contratilidade do músculo cardíaco. É interessante assinalar que a digitalina foi usada efetivamente muito tempo antes da descoberta da Na^+–K^+ ATPase. Em 1785, William Withering, um médico britânico, ouviu os relatos de uma mulher idosa, conhecida como “a velha de Shropshire”, que curava pessoas com “hidropisia” (hoje seria reconhecida como insuficiência cardíaca congestiva) com extrato de dedaleira. Withering conduziu o primeiro estudo científico dos estudos da dedaleira na insuficiência cardíaca congestiva e documentou a sua eficiência.

A dedaleira (*Digitalis purpurea*) é a fonte de digitalina, um dos medicamentos mais amplamente utilizados. [Inga Spence/Visuals Unlimited.]

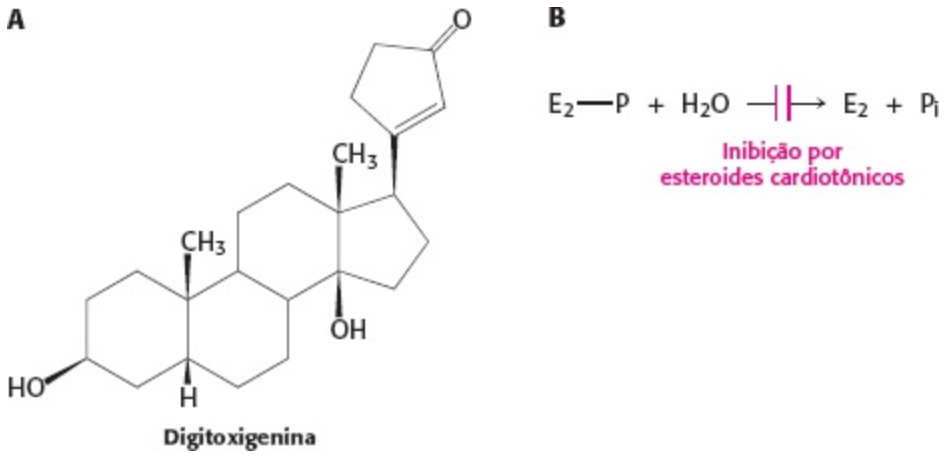


Figura 13.6 Digitoxigenina. Os esteroides cardiotônicos, como a digitoxigenina, inibem a bomba de Na^+–K^+ ao bloquearem a desfosforilação de E_2-P.

As ATPases do tipo P são conservadas evolutivamente e desempenham uma ampla variedade de funções

A análise do genoma completo da levedura revelou a presença de 16 proteínas que claramente pertencem à família de ATPases do tipo P. Uma análise mais detalhada da sequência sugere que duas dessas proteínas transportam íons H^+, duas transportam Ca^{2+}, três transportam Na^+ e duas transportam metais, como o Cu^{2+}. Além disso, cinco membros dessa família parecem participar no transporte de fosfolipídios com cabeças de aminoácidos. Essas cinco proteínas ajudam a manter a assimetria da membrana, transportando lipídios, como a fosfatidilserina, do folheto interno para o externo da membrana de bicamada. Essas enzimas foram denominadas "flipases". De modo notável, o genoma humano codifica 70 ATPases do tipo P. Todos os membros dessa família de proteínas empregam o mesmo mecanismo fundamental: a energia livre da hidrólise do ATP aciona o transporte de membrana por meio de mudanças conformacionais, que são induzidas pela adição e pela remoção

de um grupo fosforila em um sítio análogo ao aspartato em cada proteína.

A resistência a múltiplos fármacos ressalta uma família de bombas de membrana com domínios de cassete de ligação de ATP

Estudos de doenças humanas revelaram outra família grande e importante de proteínas envolvidas no transporte ativo, com estruturas e mecanismos bem diferentes daqueles da família de ATPAse do tipo P. Essas bombas foram identificadas a partir de estudos de células tumorais em cultura, que desenvolveram resistência a fármacos que, inicialmente, tinham sido muito tóxicos para as células. De modo notável, o desenvolvimento de resistência a um fármaco tornou as células menos sensíveis a uma variedade de outros compostos. Esse fenômeno é conhecido como *resistência a múltiplos fármacos*. Em uma descoberta significativa, foi constatado que o início da resistência a múltiplos fármacos se correlaciona com a expressão e a atividade de uma proteína de membrana, com massa molecular aparente de 170 kDa. Essa proteína funciona como bomba dependente de ATP, que extrai uma ampla variedade de moléculas pequenas das células que a expressam. A proteína é denominada *proteína de resistência a múltiplos fármacos* (MDR, do inglês *multidrug-resistance*) ou *glicoproteína P* ("glico", visto que ela apresenta uma porção de carboidrato). Por conseguinte, quando as células são expostas a determinado fármaco, a proteína MDR bombeia o fármaco para fora da célula antes que o fármaco possa exercer seus efeitos.

A análise das sequências de aminoácidos da proteína MDR e de proteínas homólogas revelou uma arquitetura comum (Figura 13.7A). Cada proteína compreende quatro domínios: dois domínios transmembranares e dois domínios de ligação de ATP. Os domínios de ligação ao ATP dessas proteínas são denominados *cassetes de ligação de ATP* (ABC) e são homólogos aos domínios encontrados em uma grande família de proteínas de transporte das bactérias e *archaea*. Os transportadores que incluem estes domínios são denominados *transportadores* ABC. Com 79 membros, os transportadores ABC constituem a maior família identificada no genoma de *E. coli*. O genoma humano inclui mais de 150 genes de transportadores ABC.

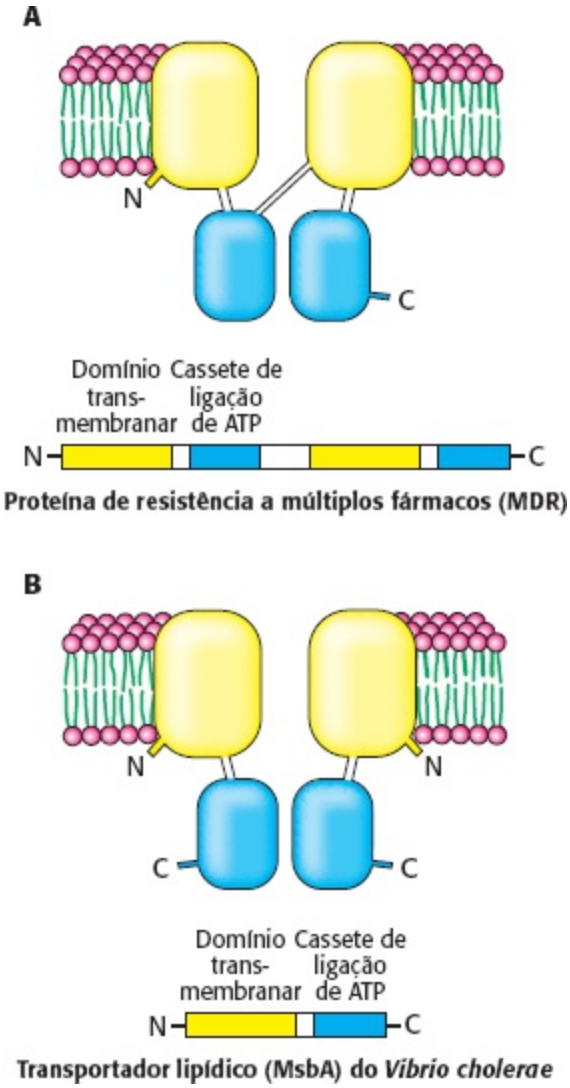


Figura 13.7 Arranjo dos domínios dos transportadores ABC. Os transportadores ABC constituem uma grande família de proteínas homólogas compostas de dois domínios transmembranares e dois domínios de ligação ao ATP, denominados cassetes de ligação de ATP (ABC). **A**. A proteína de resistência a múltiplos fármacos é uma única cadeia polipeptídica contendo todos os quatro domínios, enquanto (**B**) o transportador lipídico do *Vibrio cholerae*, MsbA, consiste em um dímero de duas cadeias idênticas, contendo um de cada domínio.

As proteínas ABC são membros da superfamília de NTPase com uma alça designada *alça P* (*P-loop*) (Seção 9.4). As estruturas tridimensionais de vários membros da família de transportadores ABC foram determinadas, incluindo a do transportador lipídico MsbA de *Vibrio cholerae*. Diferentemente da proteína MDR eucariótica, essa proteína é um dímero de cadeias de 62 kDa: a metade aminoterminal de cada proteína contém o domínio transmembranar, enquanto a metade carboxiterminal contém o cassete de ligação de ATP (Figura 13.7B). As proteínas ABC procarióticas são frequentemente constituídas de múltiplas subunidades, como um dímero de cadeias idênticas, conforme já assinalado, ou um heterotetrâmero de duas subunidades de domínios que atravessam a membrana e duas subunidades de cassetes de ligação do ATP. A consolidação das atividades enzimáticas de várias cadeias polipeptídicas nos procariotos em uma única cadeia nos eucariotos é um tema que veremos novamente. Os dois cassetes de ligação de ATP estão em contato, porém não interagem fortemente na ausência de ATP ligado (Figura 13.8). Com base nessa estrutura e em outras, bem como em outros experimentos, foi desenvolvido um mecanismo para o transporte ativo dessas proteínas (Figura 13.9).

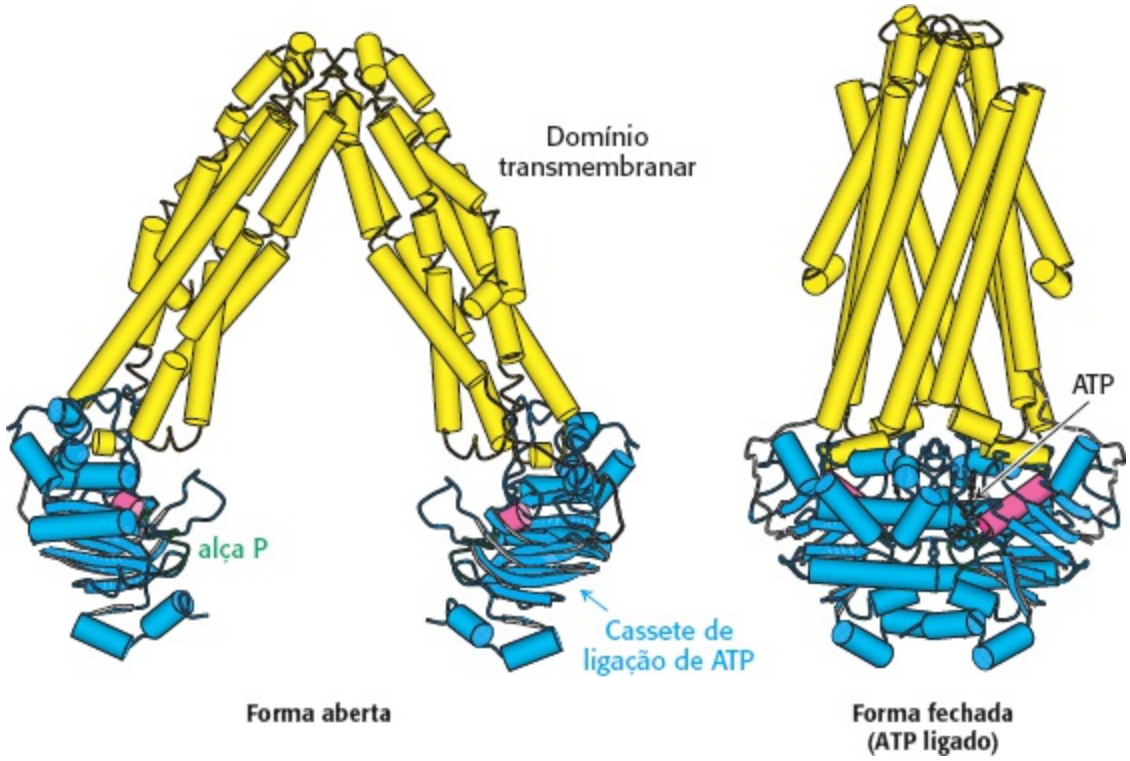


Figura 13.8 Estrutura do transportador ABC. Duas estruturas do transportador de lipídios MsbA de *Vibrio cholerae*, um transportador ABC representativo. A forma aberta está à esquerda, e a forma fechada ligada ao ATP, à direita. Os dois cassetes de ligação de ATP (azul) estão relacionados com as NTPases com alça P e, como estas, contêm laços P (verde). A α-hélice adjacente a alça P é mostrada em vermelho. [Desenhada a partir de 3B5W e 3B60.pdb.]

1. O ciclo catalítico começa com o transportador livre de ATP e de substrato. O transportador pode se interconverter entre as formas fechada e aberta.

2. O substrato entra na cavidade central da forma aberta do transportador do lado interno da célula. A ligação do substrato induz mudanças conformacionais dos cassetes de ligação de ATP, que aumentam a sua afinidade pelo ATP.

3. O ATP liga-se aos cassetes de ligação de ATP, modificando suas conformações, de tal modo que os dois domínios interagem fortemente um com o outro.

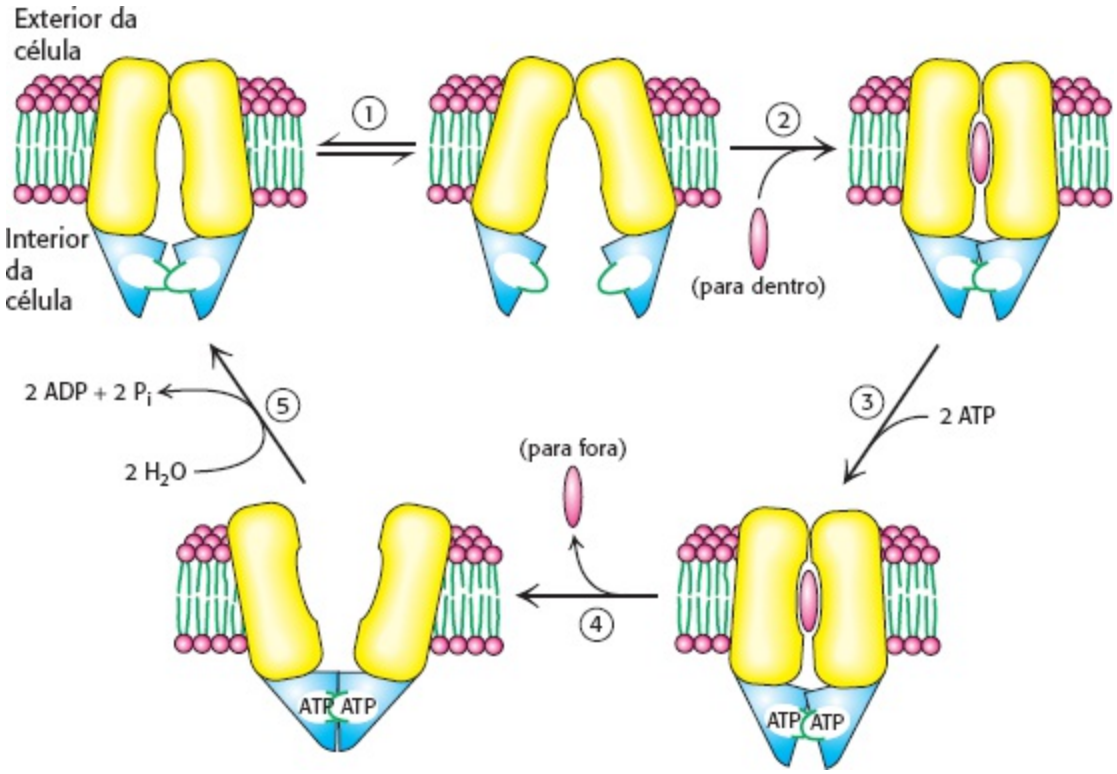


Figura 13.9 Mecanismo do transportador ABC. O mecanismo inclui as seguintes etapas (1) a abertura do canal do lado interno da célula; (2) ligação do substrato e mudanças conformacionais nos cassetes de ligação de ATP; (3) ligação do ATP e mudanças conformacionais adicionais; (4) separação dos domínios de ligação à membrana e liberação do substrato para o outro lado da membrana; e (5) hidrólise do ATP para restaurar o transportador a seu estado inicial.

4. A forte interação entre os cassetes de ligação de ATP induz uma mudança na interação entre os dois domínios que atravessam a membrana, liberando o substrato para o lado de fora da célula.

5. A hidrólise do ATP e a liberação de ADP e de fosfato inorgânico restabelecem o transportador para outro ciclo.

Enquanto os transportadores ABC dos eucariotos geralmente atuam para exportar moléculas a partir do interior da célula, os transportadores ABC procarióticos frequentemente atuam na importação de moléculas específicas a partir do *exterior* da célula. Uma proteína de ligação específica atua em associação com o transportador ABC bacteriano, liberando o substrato para o transportador e estimulando a hidrólise do ATP no interior da célula. Essas proteínas de ligação estão presentes no periplasma, o compartimento existente entre as duas membranas que circundam algumas células bacterianas (ver Figura 12.35A).

Por conseguinte, os transportadores ABC utilizam os mecanismo substancialmente diferente das ATPase do tipo P para acoplar a reação da hidrólise do ATP com mudanças conformacionais. Entretanto, o resultado final é o mesmo: os transportadores são convertidos de uma conformação capaz de se ligar ao substrato de um lado da membrana para outra com capacidade de liberar o substrato do outro lado.

13.3 Os transportadores secundários utilizam um gradiente de concentração para abastecer o próximo

Os carreadores são proteínas que transportam íons ou moléculas através da membrana, sem a necessidade de hidrólise do ATP. O mecanismo dos carreadores envolve grandes mudanças conformacionais e a interação da proteína com apenas algumas moléculas em cada ciclo de transporte, limitando a velocidade máxima com que pode ocorrer o transporte. Embora os carreadores não possam mediar o transporte ativo primário, em virtude de sua incapacidade de hidrolisar o ATP, eles podem acoplar o fluxo termodinamicamente desfavorável de um tipo de íon ou molécula *contra* um gradiente de concentração com o fluxo favorável de uma espécie diferente ao longo de um gradiente de concentração, em um processo designado como transporte ativo secundário. Os carreadores que movem íons ou moléculas dessa maneira, contra um gradiente, são denominados *transportadores secundários* ou *cotransportadores*. Essas proteínas podem ser classificadas como *antiportadores* ou *simportadores*. Os antiportadores acoplam o fluxo favorável de uma espécie com o fluxo desfavorável de outra em *sentido oposto* através da membrana; os simportadores utilizam o fluxo de uma espécie para impulsionar o fluxo de outra espécie *no mesmo sentido* através da membrana. Os *uniportadores*, outra classe de carreadores, são capazes de transportar uma espécie específica em ambos os sentidos, dependendo apenas das concentrações dessa espécie em ambos os lados da membrana (Figura 13.10).

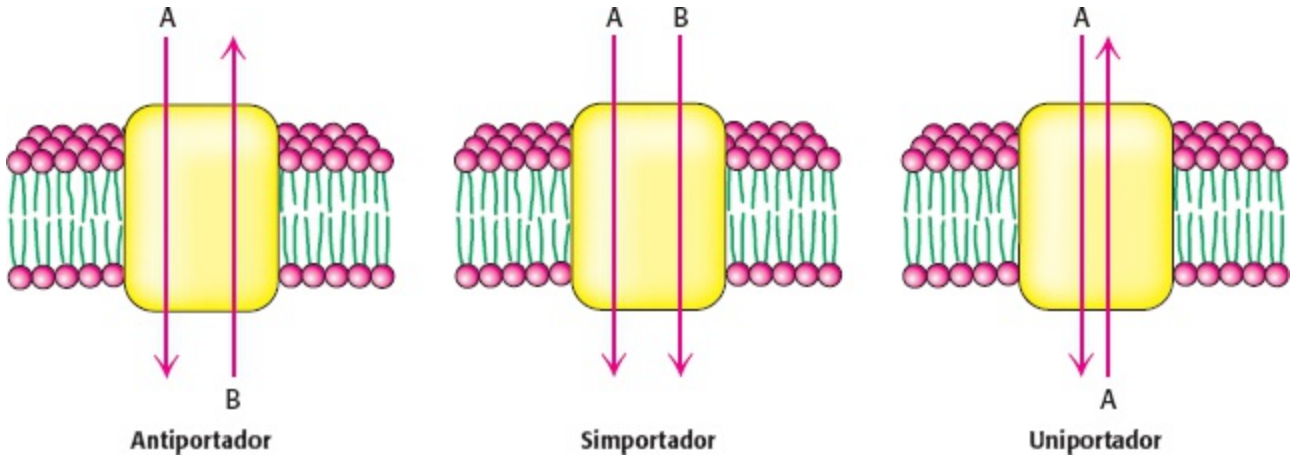


Figura 13.10 Antiportadores, simportadores e uniportadores. Os transportadores secundários podem transportar dois substratos em sentidos opostos (antiportadores), dois substratos no mesmo sentido (simportadores) ou um substrato em qualquer sentido (uniportador).

Os transportadores secundários são máquinas moleculares antigas, encontradas comumente hoje em dia em bactérias e *archaea*, bem como em eucariotos. Por exemplo, cerca de 160 (de aproximadamente 4.000) proteínas codificadas pelo genoma de *E. coli* parecem ser transportadores secundários. A comparação das sequências e a análise de hidropatia sugerem que os membros da maior família têm 12 hélices transmembranares, que parecem ter surgido de duplicação e fusão de uma proteína de membranas com seis hélices transmembranares. Nesta família está incluída a *lactose permease* de *E. coli*. Esse simportador utiliza o gradiente de H^+ através da membrana de *E. coli* (o lado de fora da membrana apresenta uma maior concentração de H^+) gerado pela oxidação de substratos energéticos para impulsionar a captação de lactose e de outros açúcares contra o gradiente de concentração. Esse transportador foi extensamente estudado durante muitas décadas e constitui um protótipo útil dessa família.

A estrutura da lactose permease foi determinada (Figura 13.11). Conforme esperado pela análise de sequência, essa estrutura consiste em duas metades, cada uma delas compreendendo seis α-hélices

que atravessam a membrana. Algumas dessas hélices são um tanto irregulares. As duas metades são bem separadas e estão unidas por um único segmento de polipeptídio. Nessa estrutura, o açúcar situa-se em uma bolsa no centro da proteína e é acessível por uma via que provém do interior da célula. Com base nessas estruturas e em outros experimentos, foi desenvolvido um mecanismo para a ação dos simportadores. Esse mecanismo (Figura 13.12) apresenta muitas características semelhantes àquelas das ATPases do tipo P e dos transportadores ABC.

1. O ciclo começa com as duas metades orientadas de modo que a abertura para a bolsa de ligação esteja voltada para o lado externo da célula, em uma conformação diferente daquela observada nas estruturas descritas até o momento. Um próton do lado de fora da célula liga-se a um resíduo na permease, possivelmente Glu 269.

2. Na forma protonada, a permease liga-se à lactose a partir do exterior da célula.

3. A estrutura passa a assumir a forma observada na estrutura cristalina (ver Figura 13.11).

4. A permease libera a lactose no interior da célula.

5. A permease libera um próton no interior da célula.

6. A permease sofre eversão para completar o ciclo.

O local de protonação provavelmente se modifica durante esse ciclo.

O mesmo mecanismo de eversão provavelmente se aplica a todas as classes de transportadores secundários que parece se assemelhar à lactose permease na sua arquitetura global.

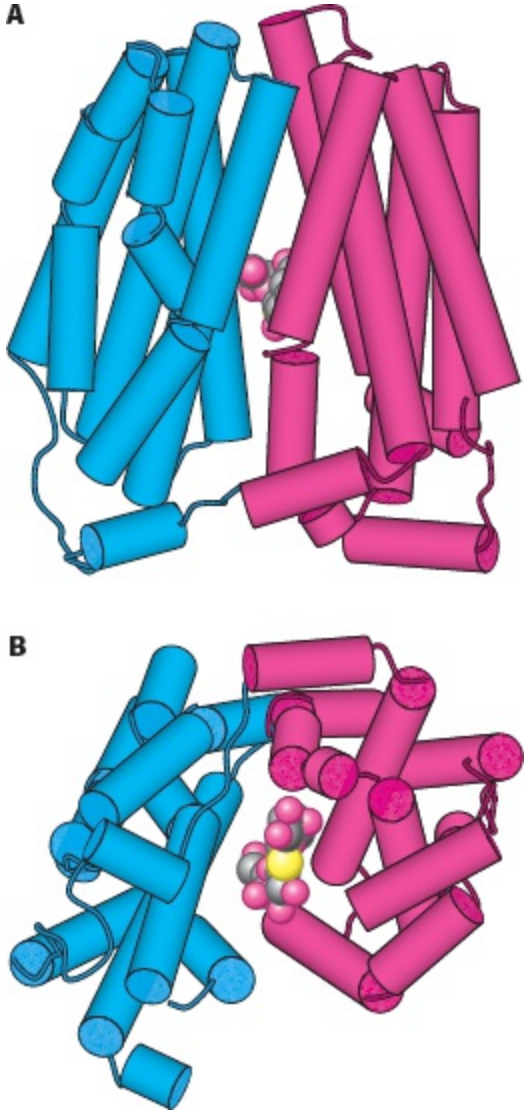


Figura 13.11 Estrutura da lactose permease com um análogo de lactose ligado. A metade aminoterminal da proteína é mostrada em azul, e a metade carboxiterminal, em vermelho. **A.** Vista lateral. **B**. Vista de baixo (do interior da célula. *Observe* que a estrutura é constituída de duas metades que circundam o açúcar e estão ligadas uma à outra por apenas um segmento de polipeptídio. [Desenhada a partir de 1PV7.pdb.]

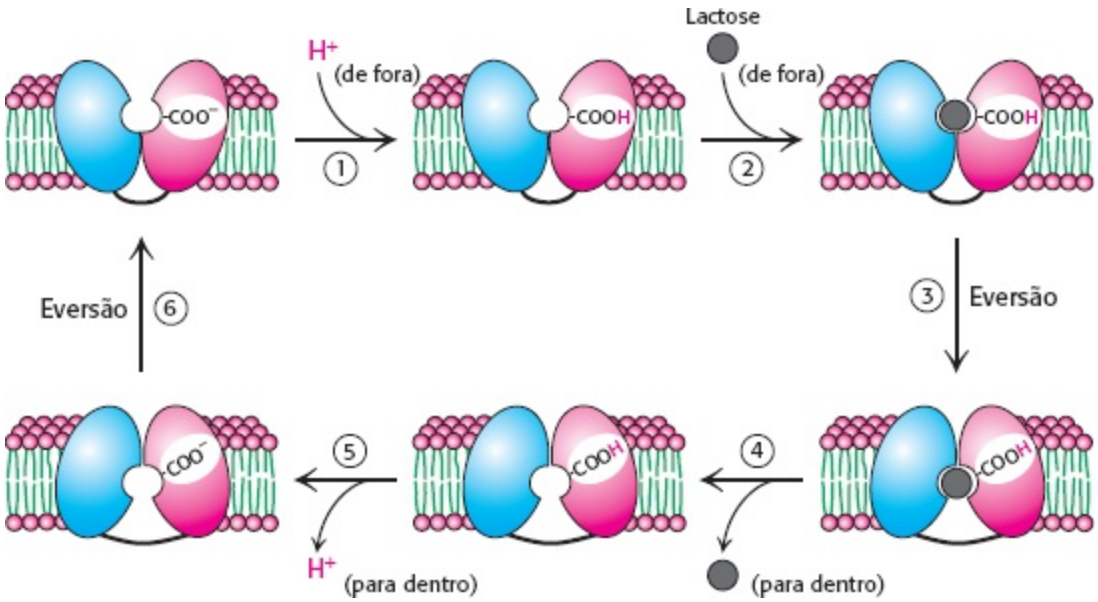


Figura 13.12 Mecanismo da lactose permease. O mecanismo começa com a permease aberta para o lado de fora da célula (parte superior, à esquerda). A permease liga-se a um próton do lado de fora da célula (1) e, a seguir, liga-se a seu substrato (2). A permease sofre eversão (3) e, em seguida, libera o seu substrato (4) e um próton (5) para dentro da célula.

Em seguida, sofre eversão (6) para completar o ciclo.

13.4 Canais específicos podem rapidamente transportar íons através das membranas

As bombas e os carreadores podem transportar íons através da membrana em velocidades de milhares de íons por segundo. Outras proteínas de membrana, os sistemas de transporte passivos denominados *canais iônicos*, são capazes de transportar íons com velocidades mais de 1.000 vezes maiores. Essas velocidades de transporte através dos canais iônicos aproximam-se da velocidade esperada para a difusão livre de íons por uma solução aquosa. Todavia, os canais iônicos não são simplesmente tubos que atravessam as membranas de um lado ao outro, através dos quais os íons podem fluir rapidamente. Com efeito, trata-se de máquinas moleculares altamente sofisticadas, que respondem a mudanças químicas e físicas de seus ambientes e sofrem alterações conformacionais precisamente cronometradas.

Os potenciais de ação são mediados por alterações transitórias na permeabilidade ao Na^+ e ao K^+

Uma das manifestações mais importantes da ação dos canais iônicos é o impulso nervoso, que constitui o meio fundamental de comunicação no sistema nervoso. Um *impulso nervoso* é um sinal elétrico produzido pelo fluxo de íons através da membrana plasmática de um neurônio. O interior de um neurônio, à semelhança da maioria das outras células, contém uma alta concentração de K^+ e uma baixa concentração de Na^+. Esses gradientes iônicos são gerados pela Na^+–K^+ ATPase. A membrana celular tem um potencial elétrico determinado pela razão entre as concentrações interna e externa de íons. No estado de repouso, o potencial de membrana é, tipicamente, de –60 mV. Um impulso nervoso ou *potencial de ação* é gerado quando o potencial de membrana é despolarizado além de um valor limiar crítico (p.ex., de –60 para –40 mV). O potencial de membrana torna-se positivo dentro de cerca de 1 milissegundo e alcança um valor de cerca de + 30 mV antes de se tornar novamente negativo (repolarização). Essa despolarização amplificada é propagada ao longo da terminação nervosa (Figura 13.13).

Experimentos engenhosos realizados por Alan Hodgkin e Andrew Huxley revelaram que os potenciais de ação surgem a partir de alterações acentuadas e transitórias na permeabilidade da membrana do axônio aos íons Na^+ e K^+. A despolarização da membrana além do limiar leva a um aumento da permeabilidade ao Na^+. Os íons sódio começam a fluir para dentro da célula, em virtude do grande gradiente eletroquímico através da membrana plasmática. A entrada de Na^+ despolariza ainda mais a membrana, levando a um aumento adicional da permeabilidade ao Na^+. Essa retroalimentação positiva leva a uma mudança muito rápida e grande no potencial de membrana, de cerca de –60 mV para + 30 mV em um milissegundo.

A membrana torna-se espontaneamente menos permeável ao Na^+ e mais permeável ao K^+. Em consequência, o K^+ flui para fora, e, desse modo, o potencial de membrana retorna a um valor negativo. O nível de repouso de –60 mV é restaurado em poucos milissegundos, à medida que a condutância ao K^+ diminui para o valor característico do estado não estimulado. A onda de despolarização seguida de repolarização move-se rapidamente ao longo de uma célula nervosa. A

propagação dessas ondas faz, por exemplo, com que um toque na ponta do dedo do pé de uma pessoa seja detectado em seu cérebro em poucos milissegundos.

Esse modelo do potencial de ação postulou a existência de canais iônicos específicos para o Na^+ e o K^+. Esses canais devem se abrir em resposta a mudanças no potencial de membrana e, em seguida, se fechar após terem permanecido abertos por um breve período de tempo. Essa hipótese audaciosa previu a existência de moléculas com um conjunto bem definido de propriedades bem antes da disponibilidade de instrumentos para a sua detecção direta e caracterização.

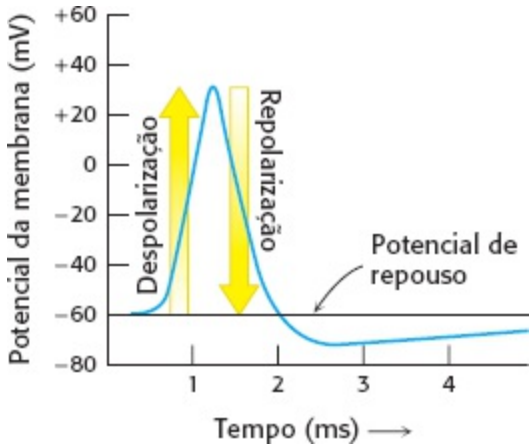


Figura 13.13 Potencial de ação. Sinais são enviados ao longo dos neurônios pela despolarização e repolarização transitórias da membrana.

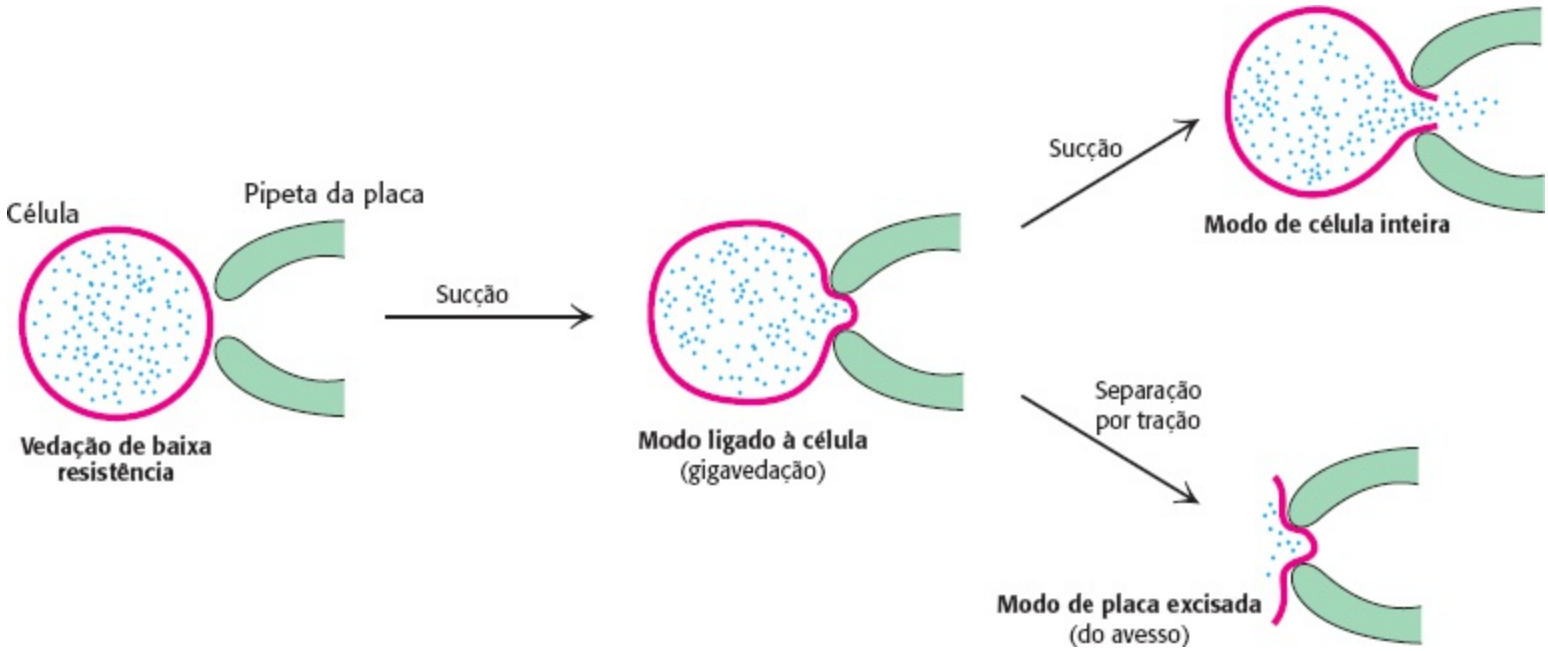


Figura 13.14 Modos de fixação de placas *(patch-clamp)*. A técnica de fixação de placas para monitoramento da atividade dos canais é altamente versátil. Uma vedação de alta resistência (gigavedação) é formada entre a pipeta e uma pequena placa da membrana plasmática. Essa configuração é denominada *modo ligado à célula* (*cell-attached mode*). A ruptura da placa de membrana por sucção aumentada produz uma via de baixa resistência entre a pipeta e o interior da célula. A atividade dos canais em toda a membrana plasmática pode ser monitorada nesse *modo de célula inteira* (*whole cell mode*). Para preparar uma membrana no modo de placa excisada (*excised patch mode*), a pipeta é afastada da célula. Um pedaço de membrana plasmática com o seu lado citoplasmático agora exposto ao meio é monitorado pela pipeta da placa.

As medições de condutância por fixação de placas (*patch-clamp*) revelam as atividades de canais isolados

A técnica de fixação de placas (*patch-clamp*), que foi introduzida por Erwin Neher e Bert Sakmann em 1976, forneceu evidências diretas para a existência desses canais. Essa técnica poderosa possibilita a medição da condutância iônica através de uma pequena placa de membrana celular. Nessa técnica, uma pipeta de vidro com ponta de diâmetro de cerca de 1 μm é comprimida contra uma célula intacta, formando uma vedação (Figura 13.14). Uma leve sucção leva à formação de uma vedação muito firme, de modo que a resistência entre o interior da pipeta e a solução que a banha é de muitos gigaohms (1 gigaohm é igual a 10^9 ohms). Por conseguinte uma vedação de gigaohm (denominada *gigavedação*) assegura que o fluxo de uma corrente elétrica através da pipeta seja idêntica à corrente que flui através da membrana coberta pela pipeta. A gigavedação possibilita a realização de medições de corrente com alta resolução, enquanto se aplica uma voltagem conhecida através da membrana. De modo notável, o fluxo de íons através de um único canal e as transições entre os estados aberto e fechado de um canal podem ser monitorados com um tempo de resolução na ordem de microssegundos (Figura 13.15). Além disso, é possível observar diretamente a atividade de um canal em seu ambiente nativo de membrana, mesmo em células intactas. Os métodos de fixação de placas (*patch-clamp*) proporcionaram uma das primeiras visões de biomoléculas isoladas em ação. Posteriormente, foram inventados outros métodos para observar moléculas isoladas, abrindo novas perspectivas em bioquímica em seu nível mais fundamental.

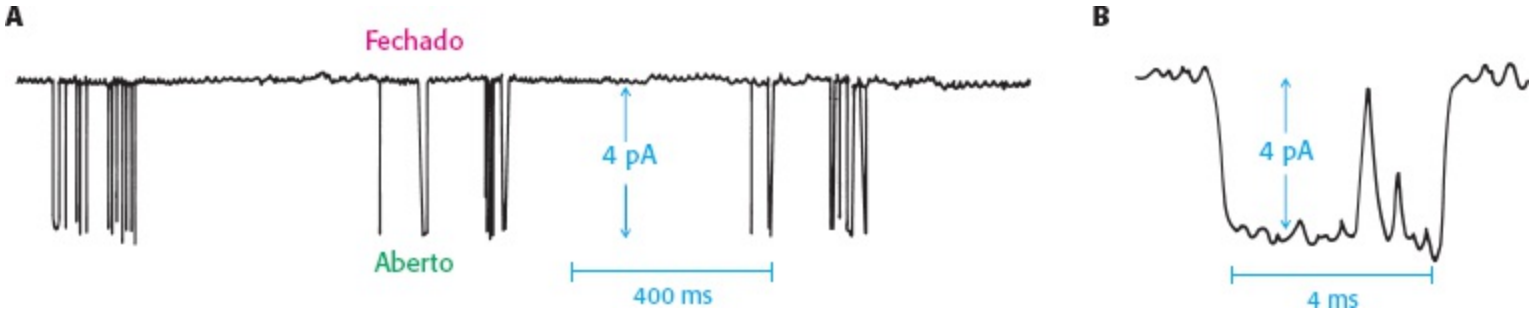


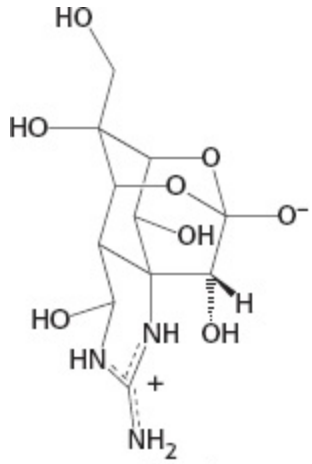
Figura 13.15 Observação de canais isolados. A. Os resultados de um experimento com fixação de placas revelam um canal iônico isolado sofrendo transição entre os estados fechado e aberto. **B.** Uma análise mais detalhada do traçado do traçado de (**A**) revela a duração em que o canal permanece no estado aberto.

A estrutura de um canal iônico de potássio é um protótipo para muitas estruturas de canais iônicos

Uma vez estabelecida firmemente a existência de canais iônicos por métodos de fixação de placas (*patch-clamp*), os cientistas procuraram identificar as moléculas que formam esses canais. O canal de Na^+ foi o primeiro a ser purificado a partir do órgão elétrico da enguia elétrica, que constitui uma fonte rica da proteína que forma esse canal. O canal foi purificado com base na sua capacidade de se ligar à tetrodotoxina, uma neurotoxina do baiacu, que se liga muito firmemente aos canais Na^+ ($K_i \approx 1$ nM). A dose letal desse veneno para um ser humano adulto é de cerca de 10 ng.

O canal de Na^+ isolado é uma única cadeia de 260 kDa. A clonagem e o sequenciamento dos cDNA que codificam os canais de Na^+ revelaram que o canal contém quatro repetições internas, cada uma delas com uma sequência semelhante de aminoácidos, sugerindo que a duplicação e a divergência gênicas produziram o gene para esse canal. Os perfis de hidrofobicidade indicam que

cada repetição contém cinco segmentos hidrofóbicos (S1, S2, S3, S5 e S6). Cada repetição também contém um segmento S4 com alta carga positiva; existem resíduos de arginina ou de lisina de carga positiva em quase cada terceiro resíduo. Foi proposto que os segmentos S1-S6 são α-hélices que atravessam a membrana, e que os resíduos de carga positiva em S4 atuam como sensores de voltagem do canal.



Tetrodotoxina

A purificação dois canais de K^+ demonstrou ser muito mais difícil, em virtude de sua pouca quantidade e da falta de ligantes conhecidos de alta afinidade comparáveis à tetrotodoxina. Os progressos vieram de estudos de moscasdas-frutas mutantes, que se agitam violentamente quando anestesiadas com éter. O mapeamento e a clonagem do gene, denominado *shaker* (agitado), responsável por esse defeito, revelou a sequência de aminoácidos codificada por um gene do canal de K^+. O gene *shaker* codifica uma proteína de 70 kDa, que contém sequências que correspondem aos segmentos S1-S6 em uma das unidades repetidas do canal de Na^+. Por conseguinte, uma subunidade do canal de K^+ é homóloga a uma das unidades repetidas dos canais de Na^+. De acordo com essa homologia, quatro polipeptídios *shaker* se unem para formar um canal funcional. Mais recentemente, foram descobertos canais de K^+ em bactérias, que contêm apenas as duas regiões transmembranares que correspondem aos segmentos S5 e S6. Esta e outras informações sugeriram que S5 e S6, incluindo a região entre eles, formam o verdadeiro poro do canal de K^+. Os segmentos S1-S4 contêm o aparelho que abre o poro. As relações de sequência entre canais iônicos estão resumidas na Figura 13.16.

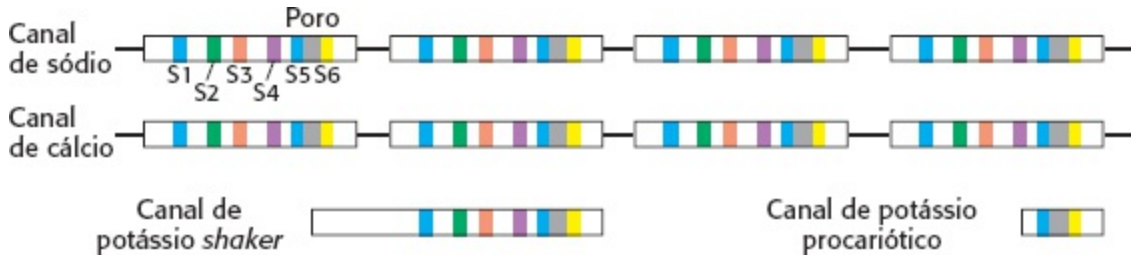


Figura 13.16 Relações de sequência dos canais iônicos. As cores semelhantes indicam regiões estruturalmente semelhantes dos canais de cálcio, sódio e potássio. Cada um desses canais exibe simetria quádrupla aproximada, seja dentro de uma cadeia (canais de sódio ou de cálcio), seja pela formação de tetrâmeros (canais de potássio).

Em 1998, Roderick MacKinnon e colaboradores determinaram a estrutura do canal de K^+ a partir da bactéria *Streptomyces lividans* por cristalografia de raios X. Esse canal contém apenas os

segmentos S5 e S6 formadores de poro. Conforme esperado, o canal de K^+ é um tetrâmero de subunidades idênticas, cada uma das quais inclui duas α-hélices transmembranares (Figura 13.17). As quatro subunidades unem-se para formar um poro com a forma de um cone, que percorre o centro da estrutura.

A estrutura de canal de íons potássio revela a base da especificidade iônica

A estrutura apresentada na Figura 13.17 provavelmente representa o canal de K^+ na forma fechada. Todavia, ela sugere como o canal tem a capacidade de excluir todos os íons, exceto o K^+. Começando do lado interno da célula, o poro apresenta inicialmente um diâmetro de cerca de 10 Å e, em seguida, fica reduzido a uma cavidade menor, com diâmetro de 8 Å. Tanto a abertura para o lado de fora quanto a cavidade central do poro são preenchidas com água, e um íon K^+ pode se encaixar no poro, sem perda de sua camada de moléculas de água ligadas. Aproximadamente a dois terços na membrana, o poro torna-se mais estreito (com diâmetro de 3 Å). Neste local, qualquer íon K^+ presente deve abandonar suas moléculas de água e interagir diretamente com os grupos da proteína. A estrutura do canal reduz efetivamente a espessura da membrana de 34 Å para 12 Å, possibilitando a penetração dos íons solvatados na membrana antes de sua interação direta com o canal (Figura 13.18).

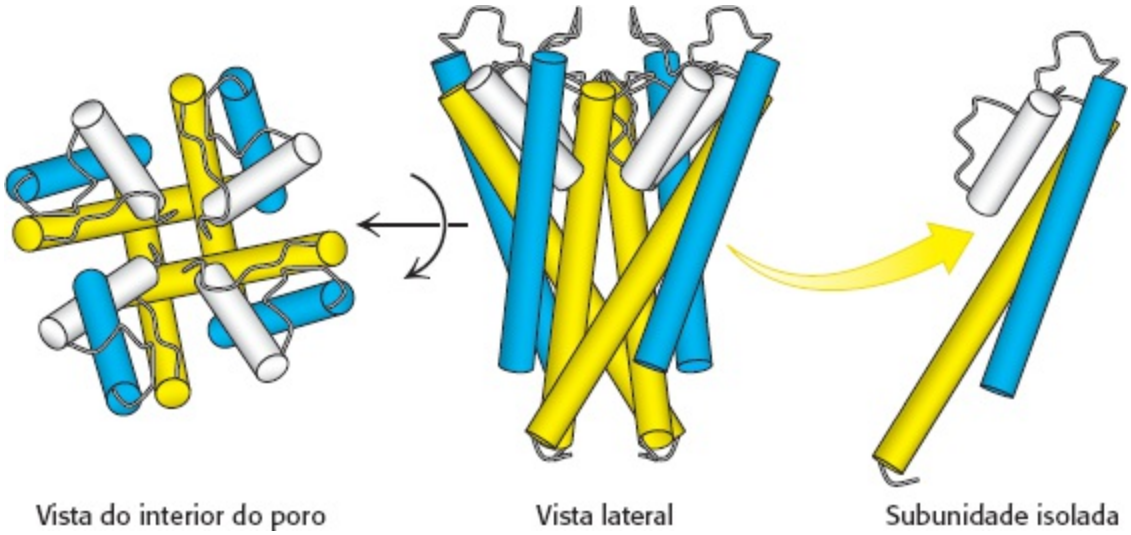


Figura 13.17 Estrutura do canal iônico de potássio. O canal de K^+, constituído de quatro subunidades idênticas, tem o formato de um cone, com a abertura maior voltada para o interior da célula (centro). Uma vista do interior do poro, olhando para fora da célula, mostra as relações das subunidades individuais (à esquerda). Uma das quatro subunidades idênticas do poro é ilustrada à direita, com a região formadora do poro indicada em cinza. [Desenhada a partir de 1K4C.pdb]

Para que os íons K^+ abandonem suas moléculas de água, outras interações polares precisam substituir as da água. A parte estreita do poro é constituída de resíduos provenientes das duas α-hélices transmembranares. Em particular, um segmento de cinco aminoácidos dentro dessa região funciona como *filtro de seletividade*, que determina a preferência pelo K^+ em relação aos outros íons (Figura 13.19). O segmento tem a sequência Thr-Val-Gly-Tyr-Gly (TVGYG) e é quase totalmente conservado em todos os canais de K^+. A região da fita que contém a sequência conservada situa-se em uma conformação distendida e está orientada de modo que os grupos carbonila do peptídio estejam direcionados para dentro do canal, em uma posição apropriada para interagir com os íons potássio.

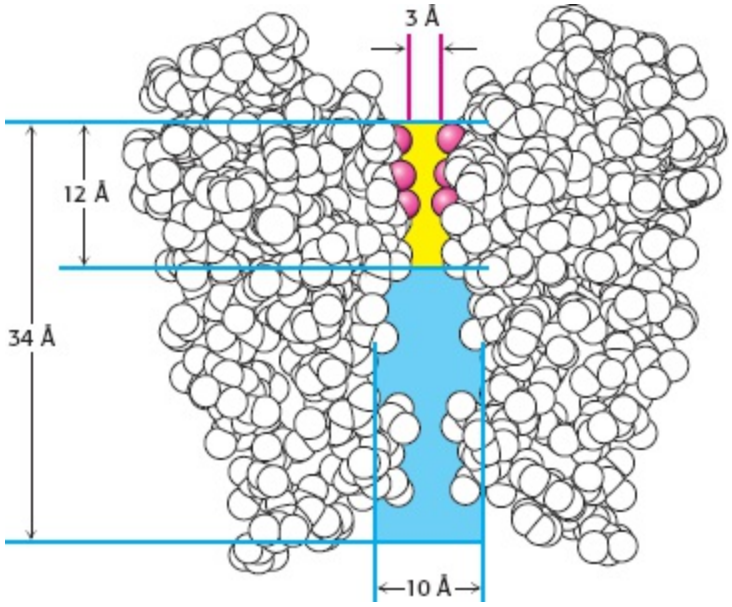


Figura 13.18 Caminho através de um canal. Um íon potássio, ao entrar no canal de K^+, pode percorrer uma distância de 22 Å na membrana, enquanto permanece solvatado com água (azul). Nesse ponto, o diâmetro do poro estreita-se para 3 Å (amarelo), e o íon potássio deve abandonar a sua água e interagir com grupos carbonila (vermelho) dos aminoácidos do poro.

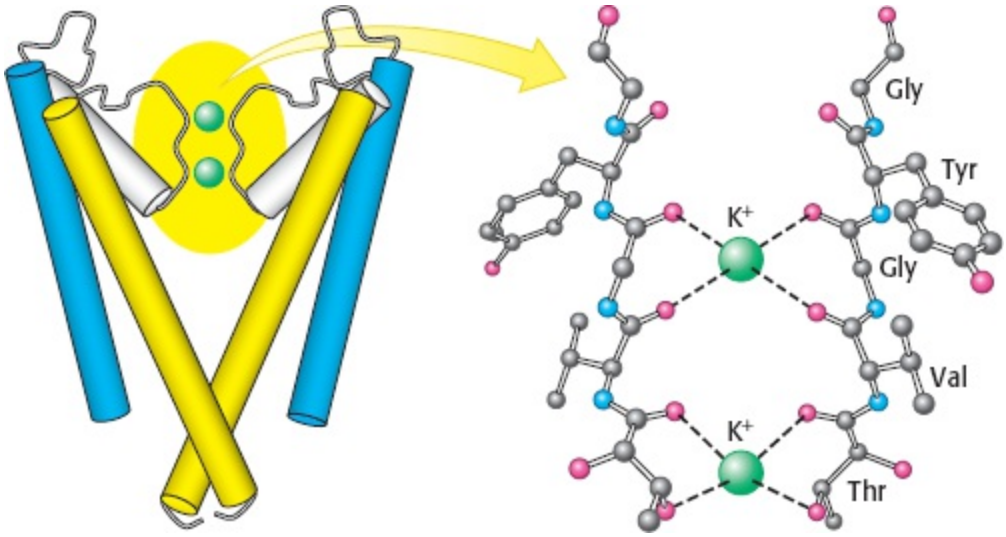


Figura 13.19 Filtro de seletividade do canal de íons potássio. Os íons potássio interagem com os grupos carbonila da sequência TVGYG do filtro de seletividade, localizada no poro do canal de K^+ com diâmetro de 3 Å. São mostradas apenas duas das quatro subunidades do canal.

Os canais de íons potássio são 100 vezes mais permeáveis ao K^+ do que ao Na^+. Como esse alto grau de seletividade é alcançado? Os íons que apresentam um raio maior que 1,5 Å não podem passar pelo diâmetro estreito (3 Å) do filtro de seletividade do canal de K^+. Entretanto, um Na^+ desnudo é pequeno o suficiente (Tabela 13.1) para atravessar o poro. Com efeito, o raio iônico do Na^+ é substancialmente menor que o do K^+. Como então o Na^+ é rejeitado?

Tabela 13.1 Propriedades dos cátions alcalinos.

Íon	Raio iônico (Å)	Energia livre de hidratação em kJ mol^{-1} (kcal mol^{-1})
Li^+	0,60	– 410 (– 98)
Na^+	0,95	– 301 (– 72)

K^+	1,33	– 230 (– 55)
Rb^+	1,48	–213 (– 51)
Cs^+	1,69	–197 (– 47)

O ponto importante é que os custos de energia livre para a desidratação desses íons são consideráveis [Na^+, 301 kJ mol^{-1} (72 kcal mol^{-1}) e K^+, 230 kJ mol^{-1} (55 kcal mol^{-1})] *O canal paga o custo para a desidratação do K^+ ao proporcionar interações compensatórias com os átomos de oxigênio carbonílicos que revestem o filtro de seletividade*. Todavia, esses átomos de oxigênio estão posicionados de tal modo que não podem interagir favoravelmente com o Na^+, visto que este íon é demasiado pequeno (Figura 13.20). Os íons sódio são rejeitados, pois o maior custo para desidratá-los seria irrecuperável. O canal de íons potássio evita aceitar os íons sódio, que precisam permanecer hidratados e que, portanto, não podem passar pelo canal.

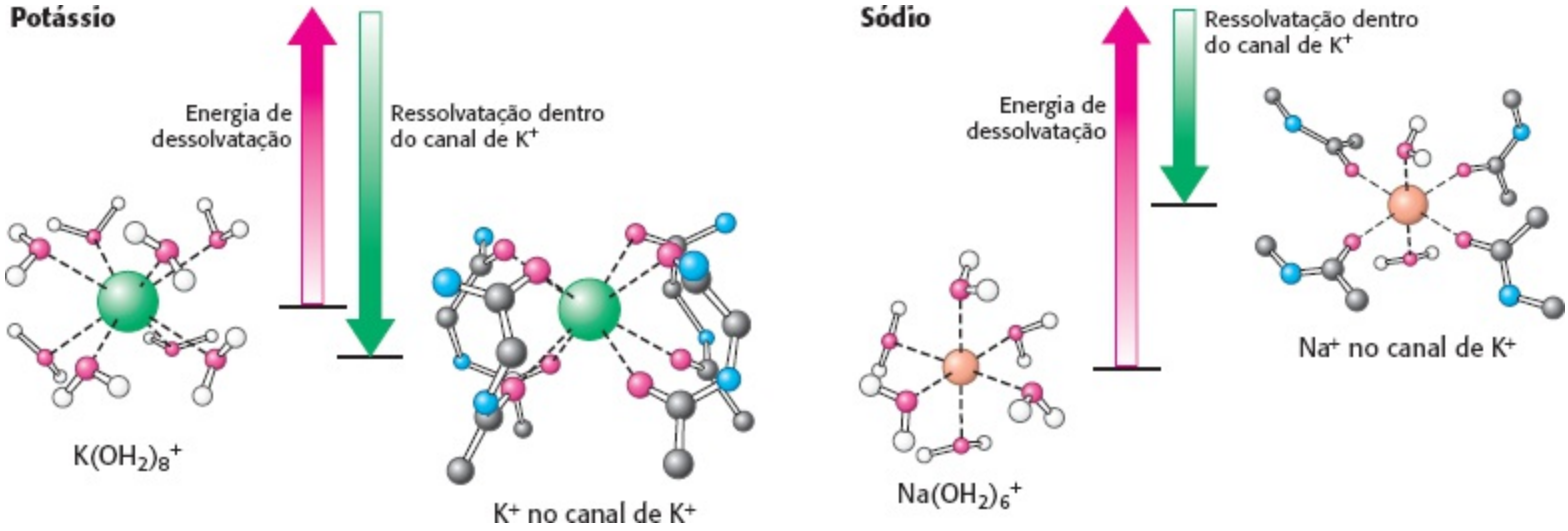


Figura 13.20 Base energética da seletividade iônica. O custo energético para a desidratação de um íon potássio é compensado pelas interações favoráveis com o filtro de seletividade. Como um íon sódio é demasiadamente pequeno para interagir favoravelmente com o filtro de seletividade, a energia livre de dessolvatação não pode ser compensada, e o íon sódio não atravessa o canal.

A estrutura dos canais de K^+ proporciona uma compreensão mais clara da estrutura e da função dos canais de Na^+ e Ca^{2+}, devido à sua homologia com os canais de K^+. A comparação das sequências e os resultados de experimentos de mutagênese implicaram a região situada entre os segmentos S5 e S6 na seletividade iônica dos canais de Ca^{2+}. Nestes canais, um resíduo de glutamato dessa região em cada uma das quatro unidades repetidas, desempenha um importante papel na determinação da seletividade iônica. Os resíduos nas posições que correspondem aos glutamatos nos canais de Ca^{2+} constituem os principais componentes do filtro de seletividade do canal de Na^+. Esses resíduos – aspartato, glutamato, lisina e alanina – estão localizados em cada uma das repetições internas do canal de Na^+, formando uma região denominada *locus* DEKA. Por conseguinte, a simetria quádrupla potencial do canal é claramente rompida nessa região, o que explica por que os canais de Na^+ consistem em uma única cadeia polipeptídica grande, em lugar de uma montagem não covalente de quatro subunidades idênticas. A preferência do canal de Na^+ pelo Na^+ ao K^+ depende do raio

iônico; o diâmetro do poro determinado por esses resíduos e outros é restrito o suficiente para que pequenos íons, como o Na^+ e o Li^+, possam passar através do canal, enquanto íons maiores, como o K^+, são significativamente impedidos de fazê-lo.

A estrutura do canal de íons potássio explica a sua grande velocidade de transporte

Os sítios de ligação firmes necessários para a seletividade iônica deveriam reduzir a velocidade de progressão dos íons através de um canal; contudo, os canais iônicos alcançam altas velocidades de transporte iônico. Como esse paradoxo é resolvido? Uma análise estrutural do canal de K^+ em alta resolução fornece uma explicação atraente. Quatro sítios de ligação de K^+ cruciais para o rápido fluxo de íons estão presentes na região estreita do canal de K^+. Consideremos o processo de condutância dos íons a partir do interior da célula (Figura 13.21). Um íon potássio hidratado percorre o canal e passa pela sua parte relativamente larga. Em seguida, o íon abandona suas moléculas de água coordenadas e liga-se a um sítio dentro da região do filtro de seletividade. O íon pode se mover entre os quatro sítios dentro do filtro de seletividade, visto que apresentam afinidades iônicas semelhantes. À medida que cada íon potássio subsequente se move para dentro do filtro de seletividade, sua carga positiva repele o íon potássio no sítio mais próximo, provocando o seu deslocamento para um sítio mais distante no canal e, então, empurrando para a frente qualquer íon potássio que já esteja ligado a um sítio mais adiante. Por conseguinte, cada novo íon que se liga favorece a liberação de um íon do outro lado do canal. Esse mecanismo de múltiplos sítios de ligação soluciona o paradoxo da alta seletividade iônica e fluxo rápido.

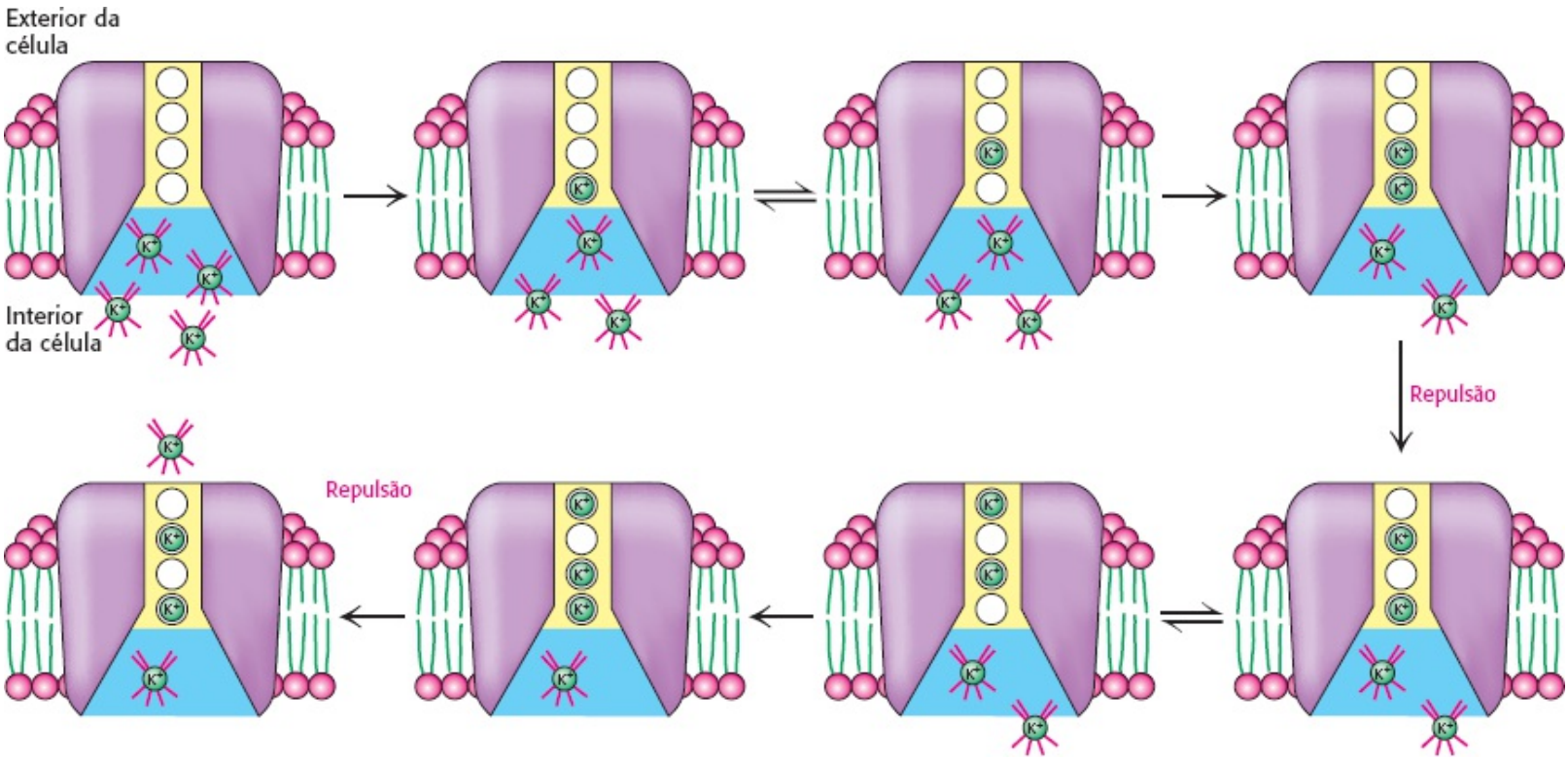


Figura 13.21 Modelo para o transporte iônico do canal de K^+. O filtro de seletividade tem quatro sítios de ligação. Os íons potássio hidratados podem entrar nesses locais, um de cada vez, com perda de sua camada de hidratação. Quando dois íons ocupam sítios adjacentes, a forças de repulsão eletrostáticas os separam. Assim, à medida que íons entram no canal a partir de um lado, outros íons são expulsos no outro lado.

A regulagem por voltagem exige mudanças substanciais de conformação em domínios específicos dos canais iônicos

Alguns canais de Na^+ e K^+ são regulados pelo potencial de membrana, isto é, sofrem uma mudança conformacional para uma forma de alta condutância em resposta a variações na voltagem através da membrana. Conforme já assinalado, esses *canais regulados por voltagem* incluem os segmentos S1-S4, além do próprio poro formado por S5 e S6. A estrutura de um canal de K^+ regulado por voltagem de *Aeropyrum pernix* foi determinada por cristalografia de raios X (Figura 13.22). Os segmentos S1-S4 formam domínios, denominados "remos", que se estendem a partir do cerne do canal. Esses remos incluem o segmento S4, o próprio sensor de voltagem. O segmento S4 forma uma α-hélice revestida de resíduos de carga positiva. Contrariamente às expectativas, os segmentos S1-S4 não estão confinados dentro da proteína, mas estão posicionados para serem encontrados na própria membrana.

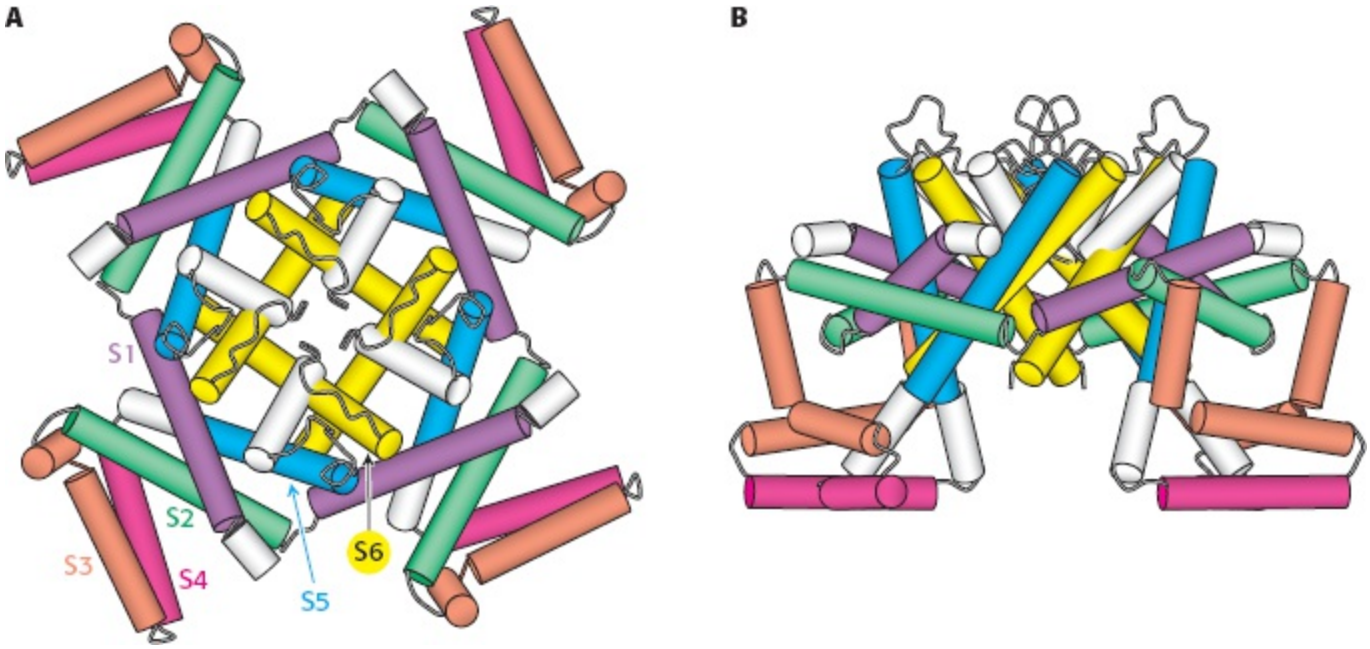


Figura 13.22 Estrutura de um canal de potássio regulado por voltagem. A. Vista interior do poro. **B.** Vista lateral. *Observe* que a região S4 de carga positiva (vermelho) situa-se fora da estrutura no fundo do poro. [Desenhada a partir de 1ORQ.pdb.]

Roderick MacKinnon e colaboradores propuseram um modelo de regulagem por voltagem, com base nessa estrutura e em uma variedade de outros experimentos (Figura 13.23). No estado fechado, os remos localizam-se em uma posição "para baixo". Com a despolarização da membrana, o lado citoplasmático da membrana torna-se mais positivo, e os remos são arrastados através da membrana para uma posição "para cima". Nesta posição, afastam os quatro lados da base do poro, aumentando o acesso ao filtro de seletividade e abrindo o canal.

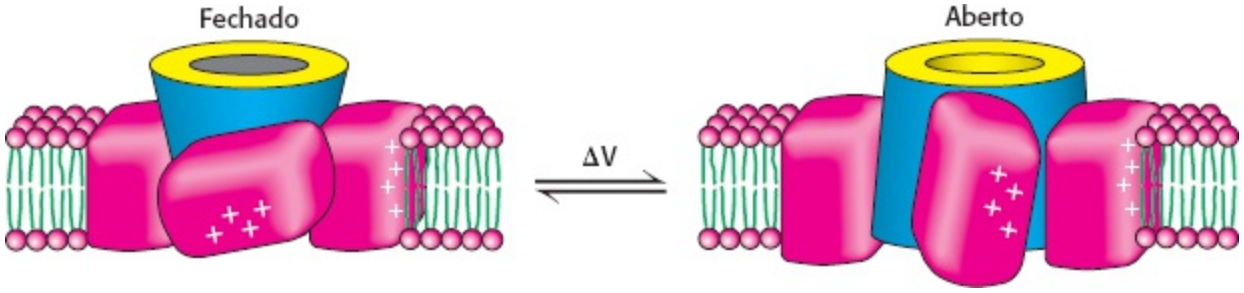


Figura 13.23 Um modelo para a regulagem dos canais iônicos por voltagem. Os "remos" sensores de voltagem situam-se na posição "para baixo", abaixo do canal fechado (à esquerda). A despolarização da membrana arrasta esses remos através da membrana. O movimento afasta a base do canal, abrindo-o (à direita).

Um canal pode ser inativado pela inclusão do poro: o modelo de bola e cadeia

Os canais de K^+ e de Na^+ sofrem inativação dentro de milissegundos após a sua abertura (Figura 13.24). O primeiro indício do mecanismo de inativação veio da exposição do lado citoplasmático de cada canal à tripsina; a clivagem pela tripsina produziu canais "aparados", que permaneciam persistentemente abertos após a despolarização. Além disso, um canal mutante *Shaker*, que carece de 42 aminoácidos próximos à extremidade aminoterminal abria-se em resposta à despolarização, porém não era inativado. De modo notável, a inativação foi restaurada pela adição de um peptídio sintético correspondendo aos primeiros 20 resíduos do canal nativo.

Esses experimentos sustentam fortemente o *modelo de bola e cadeia* para a inativação dos canais, que foi proposto alguns anos antes (Figura 13.25). De acordo com esse modelo, os primeiros 20 resíduos do canal de K^+ formam uma unidade citoplasmática (a *bola*) que se fixa a um segmento flexível do peptídio (a *cadeia*). Quando o canal está fechado, a bola rota livremente na solução aquosa. Quando o canal abre, a bola rapidamente encontra um sítio complementar no poro aberto e o veda. Por conseguinte, o canal só se abre por um breve intervalo de tempo antes de sofrer inativação por oclusão. O encurtamento da cadeia acelera a inativação, visto que a bola encontra o seu alvo mais rapidamente. Por outro lado, o aumento da cadeia diminui a velocidade de inativação. Assim, a duração do estado aberto pode ser controlada pelo comprimento e pela flexibilidade da corrente. De certo modo, os domínios de "bola" que incluem regiões substanciais de carga positiva, podem ser considerados grandes cátions acorrentados, que podem ser levados para dentro do canal aberto, mas que ficam presos, bloqueando a condutância adicional de íons.

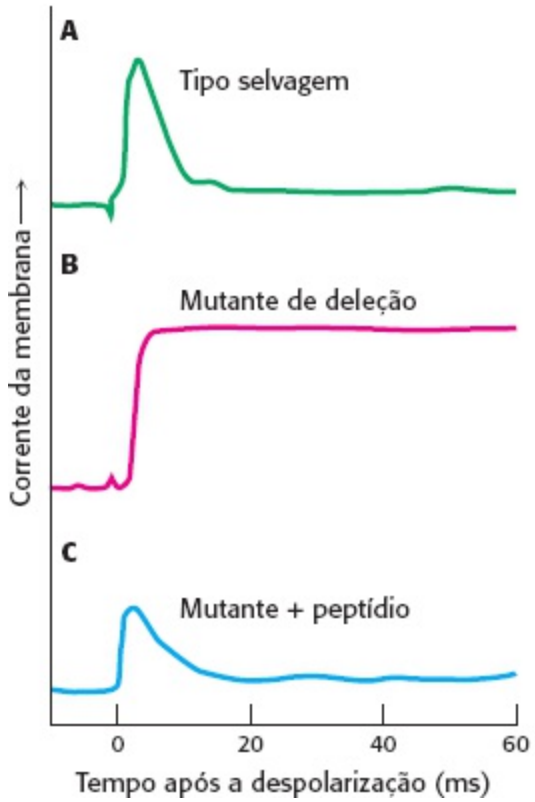


Figura 13.24 Inativação do canal de íons potássio. A região aminoterminal do canal de K^+ é crítica para a inativação. **A.** O canal de K^+ *Shaker* selvagem exibe rápida inativação após a sua abertura. **B.** Um canal mutante, que carece dos resíduos 6 a 46, não sofre inativação. **C.** A inativação pode ser restaurada pela adição de um peptídio constituído dos resíduos 1 a 20, em uma concentração de 100 μM. [De W. N. Zagotta, T. Hoshi and R. W. Aldrich. *Science* 250(1990):568-571.]

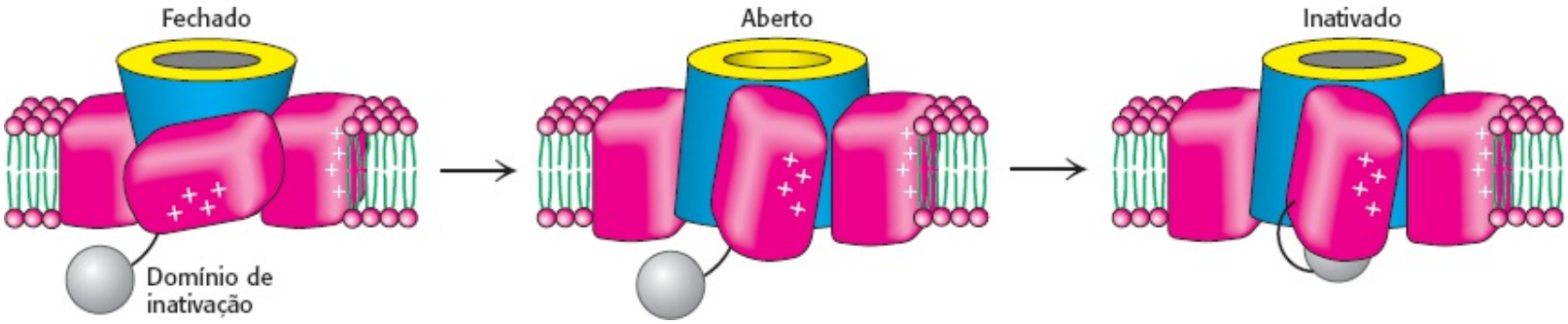
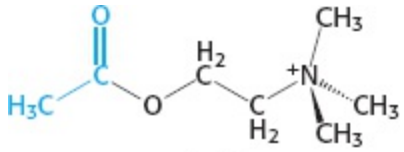


Figura 13.25 Modelo de bola e cadeia para a inativação do canal. O domínio de inativação ou "bola" (cinza) está fixado ao canal por uma "cadeia" flexível. No estado fechado, a bola está localizada no citoplasma. A despolarização abre o canal e cria um sítio de ligação para a bola de carga positiva na boca do poro. O movimento da bola para esse sítio inativa o canal e o oclui.

O receptor de acetilcolina é um protótipo dos canais iônicos regulados por ligantes

Os impulsos nervosos são transmitidos através das sinapses por pequenas moléculas difusíveis, denominadas *neurotransmissores*. A *acetilcolina* é um desses neurotransmissores. A membrana pré-sináptica de uma sinapse é separada da membrana pós-sináptica por um espaço de cerca de 50 nm, denominado *fenda sináptica*. A chegada de um impulso nervoso na extremidade de um axônio provoca a saída sincronizada do conteúdo de cerca de 300 vesículas de acetilcolina na fenda (Figura 13.26). A ligação da acetilcolina à membrana pós-sináptica modifica acentuadamente a sua permeabilidade a íons, deflagrando um potencial de ação. A acetilcolina abre um único tipo de canal catiônico, denominado *receptor de acetilcolina*, que é quase igualmente permeável ao Na^+ e ao K^+.



Acetilcolina

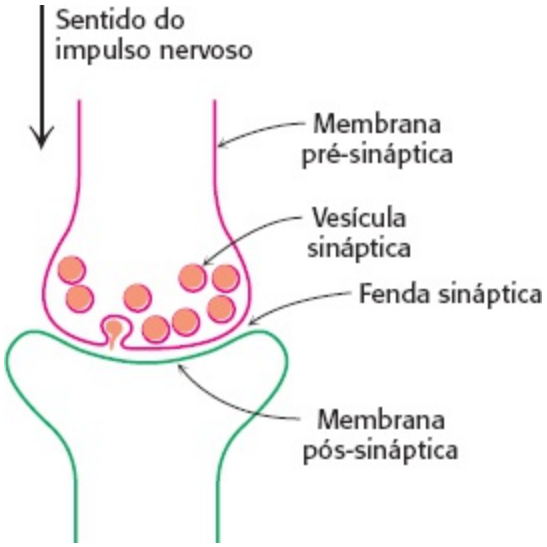


Figura 13.26 Representação esquemática de uma sinapse.

O receptor de acetilcolina constitui o *canal regulado por ligante* mais bem conhecido. Esse tipo de canal não é regulado por voltagem, mas pela presença de ligantes específicos. A ligação de acetilcolina ao canal é seguida de sua abertura transitória. O órgão elétrico de *Torpedo marmorata*, uma arraia elétrica, constitui uma fonte de escolha para o estudo dos receptores de acetilcolina, visto que suas eletroplacas (células geradoras de voltagem) são muito ricas em membranas pós-sinápticas que respondem a esse neurotransmissor. O receptor encontra-se densamente agrupado nessas membranas (cerca de 20.000 μm^{-2}). O receptor de acetilcolina do órgão elétrico foi solubilizado pela adição de um detergente não iônico a uma preparação de membrana pós-sinápticas e purificado por cromatografia de afinidade em uma coluna com cobratoxina ligada de modo covalente, uma pequena proteína tóxica de serpentes que apresenta alta afinidade pelos receptores de acetilcolina. Com o uso de técnicas apresentadas com Capítulo 3, o receptor de 268 kDa foi identificado como um pentâmero de quatro tipos de subunidades transmembranares – α_2, β, γ e δ – dispostas na forma de um anel que cria um poro através da membrana.

A clonagem e o sequenciamento dos cDNA dos quatro tipos de subunidades (50 a 58 kDa) mostraram que elas apresentam sequências claramente semelhantes. Os genes para as subunidades α,β, γ e δ surgiram por duplicação e divergência de um gene ancestral comum. Cada subunidade apresenta um grande domínio extracelular, seguido na extremidade carboxílica, de quatro segmentos predominantemente hidrofóbicos que atravessam a bicamada da membrana. A acetilcolina liga-se a interfaces α-γ e α-δ. Os estudos de microscopia eletrônica dos receptores de acetilcolina purificados demonstraram que a estrutura exibe uma simetria pentagonal aproximada, em harmonia com a semelhança de suas cinco subunidades constituintes (Figura 13.27).

O torpedo (*Torpedo marmorata*, também conhecido como arraia elétrica) têm um órgão elétrico, rico em receptores de acetilcolina, que pode desferir um choque de até 200 V em aproximadamente 1 s. [Yves Gladu/Jacana/Photo Researchers.]

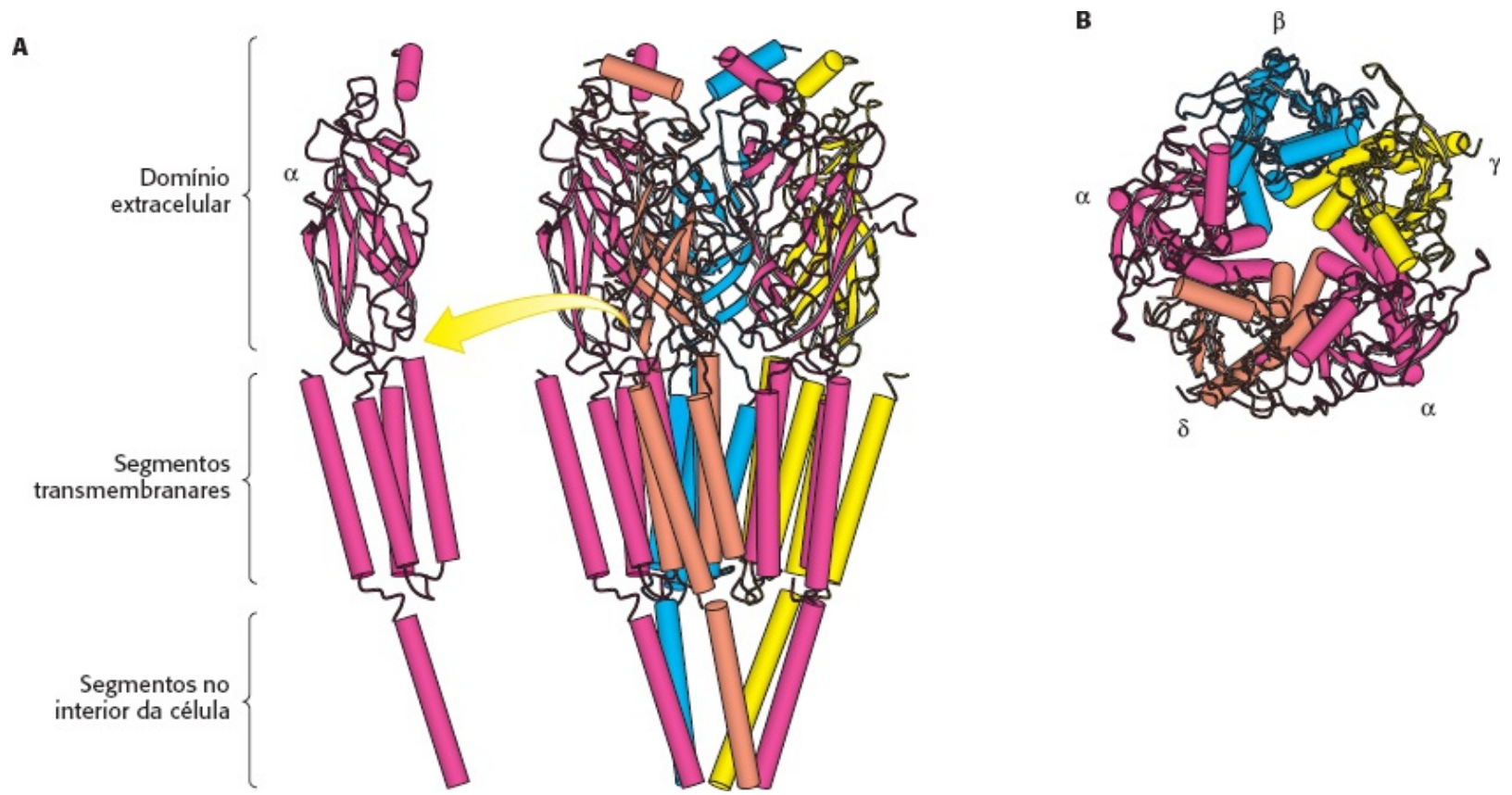


Figura 13.27 Estrutura do receptor de acetilcolina. Um modelo para a estrutura do receptor de acetilcolina, deduzido a partir de estudos de microscopia eletrônica de alta resolução, revela que cada subunidade é constituída de um grande domínio extracelular, composto principalmente de fitas β, quatro α-hélices transmembranares e uma α-hélice final no interior da célula. **A.** Uma vista lateral mostra o receptor pentamérico com cada tipo de subunidade em uma cor diferente. Um exemplar da subunidade α é mostrado isoladamente. **B.** Vista do interior do canal, do lado de fora da célula. [Desenhada a partir de 2BG9.pdb.]

Qual é a base da abertura do canal? Uma comparação das estruturas das formas fechada e aberta do canal seria muito reveladora, porém tem sido difícil obter essas comparações. Micrografias crioeletrônicas indicam que a ligação da acetilcolina ao domínio extracelular provoca uma alteração estrutural, que inicia rotação das hastes helicoidais que revestem o poro transmembranar. As sequências de aminoácidos dessas hélices apontam para a presença de cristas alternadas de pequenos resíduos polares ou neutros (serina, treonina, glicina) e apolares grandes (isoleucina, leucina, fenilalanina). No estado fechado, os grandes resíduos podem causar oclusão do canal, formando um anel hidrofóbico rígido (Figura 13.28). Com efeito, cada subunidade apresenta um resíduo volumoso de leucina em uma posição crítica. A ligação da acetilcolina poderia determinar a rotação alostérica das hélices transmembranares, de modo que o poro ficasse revestido por pequenos resíduos polares, e não por grandes resíduos hidrofóbicos. O poro mais polar e mais largo seria então aberto para a passagem de íons Na^+ e K^+.

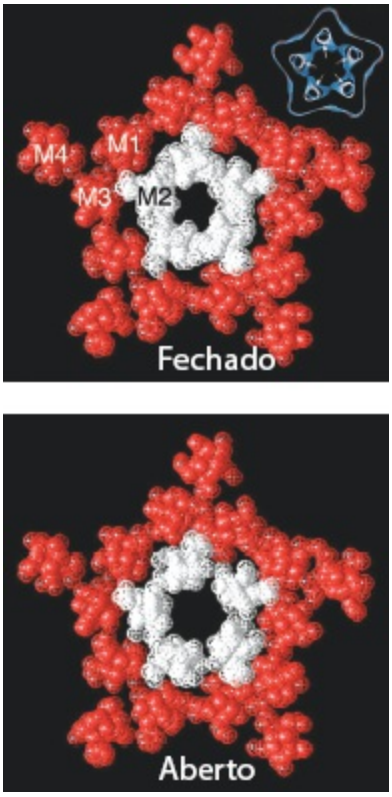


Figura 13.28 Abertura do receptor de acetilcolina. Cortes transversais de reconstruções de microscopia eletrônica do receptor de acetilcolina em suas formas fechada (parte superior) e aberta (parte inferior). A forma aberta corresponde à estrutura mostrada na Figura 13.27. As áreas designadas por M1, M2, M3 e M4 correspondem às quatro α-hélices transmembranares de uma subunidade. O corte transversal do canal aberto foi obtido mediante tratamento do receptor com acetilcolina e congelamento da amostra dentro de 20 ms. *Observe* que a cavidade no centro do canal é substancialmente maior na estrutura aberta. O aumento da cavidade é devido à rotação das hélices M2 em aproximadamente 15° ao longo de seus eixos mais longos. [Cortesia de Nigel Unwin.]

Os potenciais de ação integram as atividades de vários canais iônicos que atuam em conjunto

Para entendermos como os canais regulados por ligantes e regulados por íons trabalham em conjunto para gerar uma resposta fisiológica sofisticada, retornemos ao potencial de ação introduzido no início dessa seção. Em primeiro lugar, precisamos introduzir o conceito de *potencial de equilíbrio*. Suponha que uma membrana separe duas soluções contendo diferentes concentrações do mesmo cátion X^+ (Figura 13.29). Suponha que $[X^+]_{int}$ seja a concentração de X^+ em um lado da membrana (correspondendo ao interior da célula) e $[X^+]_{ext}$ seja a concentração de X^+ no outro lado (correspondendo ao exterior da célula). Suponha, ainda, que um canal iônico se abra para possibilitar o deslocamento de X^+ através da membrana. O que irá acontecer? Parece claro que X^+ se moverá através do canal do lado de maior concentração para o lado de menor concentração. Entretanto, cargas positivas começarão a se acumular no lado da menor concentração, tornando mais difícil mover cada íon adicional de carga positiva. Será alcançado um equilíbrio quando a força motriz devida ao gradiente de concentração for equilibrada pela força eletrostática que resiste ao movimento de uma carga adicional. Nessas circunstâncias, o potencial de membrana é fornecido pela *equação de Nernst*:

$$V_{eq} = -(RT/zF) \ln ([X]_{int}/[X]_{ext})$$

em que R é a constante de gases, e F a constante de Faraday (96,5 $kJV^{-1}\ mol^{-1}$ ou 23,1 $kcal\ V^{-1}\ mol^{-1}$)

e z é a carga do íon X (p.ex., +1 para X^+).

O potencial de membrana em equilíbrio é denominado potencial de equilíbrio para determinado íon, em um determinada razão de concentração através de uma membrana. Para o sódio com $[Na^+]_{int}$ = 14 mM e $[Na^+]_{ext}$ = 143 mM, o potencial de equilíbrio é + 62 mV a 37°C. De modo semelhante, para o potássio com $[K^+]_{int}$ = 157 mM e $[K^+]_{ext}$ = 4 mM, o potencial de equilíbrio é de – 98 mV. Na ausência de estímulo, o potencial de repouso para um neurônio típico é de – 60 mV. Esse valor aproxima-se do potencial de equilíbrio do K^+, devido ao fato de que um pequeno número de canais de K^+ estão abertos.

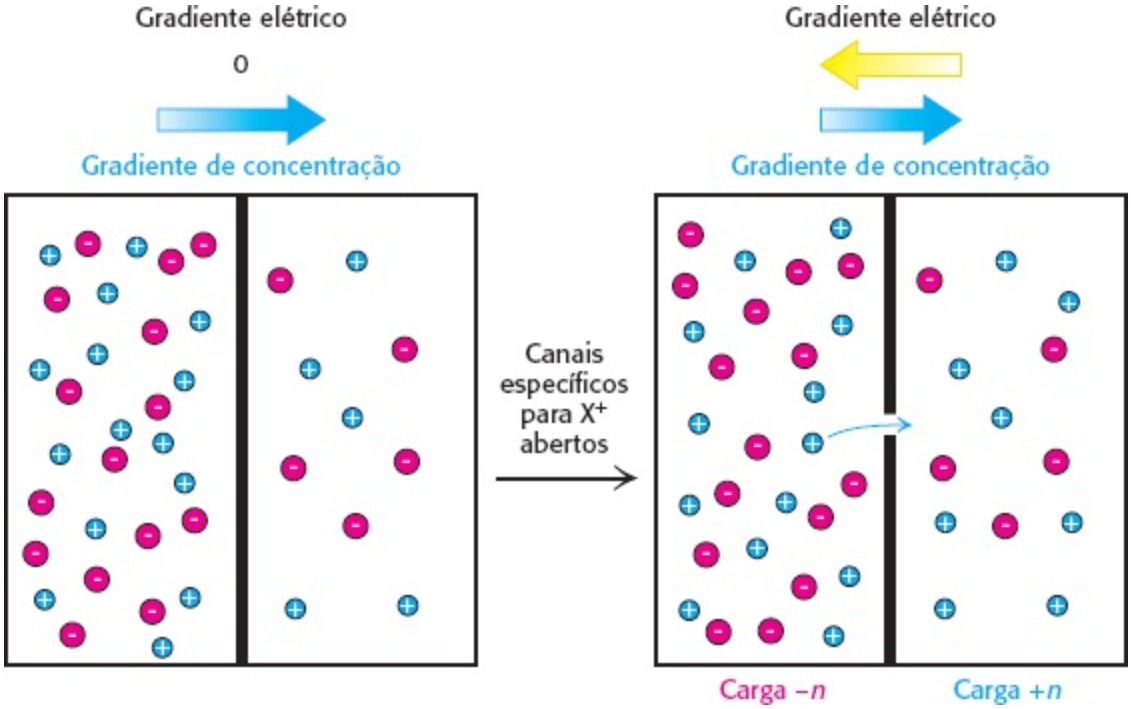


Figura 13.29 Potencial de equilíbrio. O potencial de membrana alcança um equilíbrio quando a força motriz devido ao gradiente de concentração é exatamente equilibrada pela força oposta, devido à repulsão de cargas semelhantes.

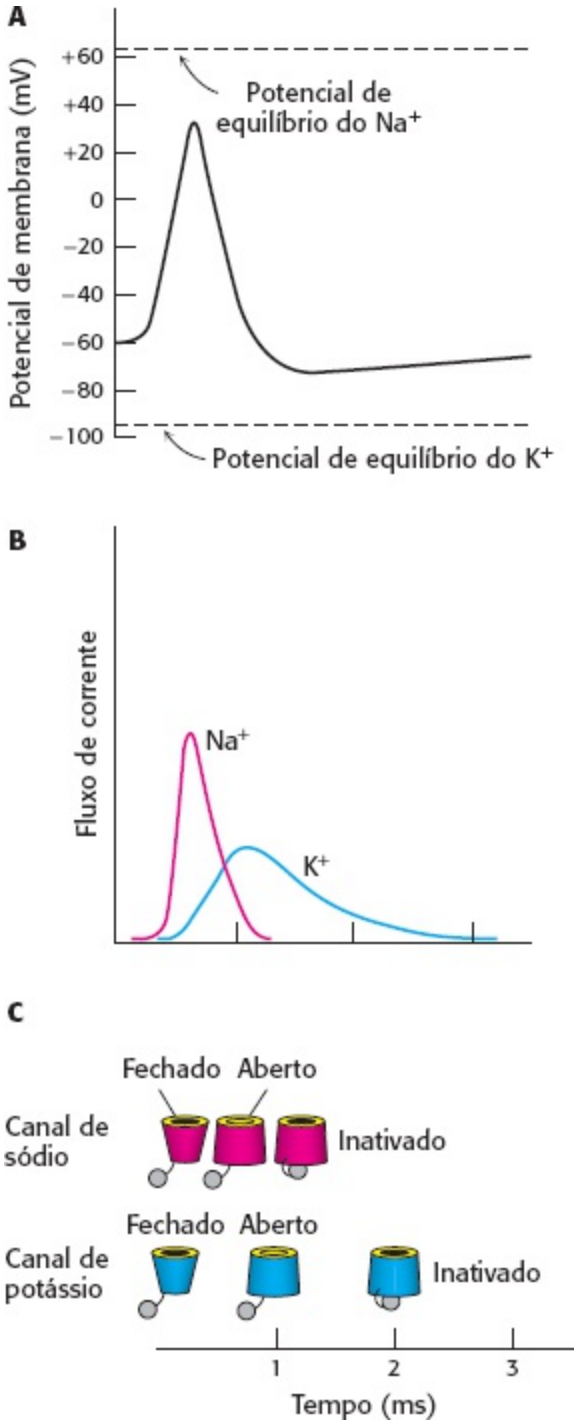


Figura 13.30 Mecanismo do potencial de ação. A. No início de um potencial de ação, o potencial de membrana move-se do potencial de repouso para cima, em direção ao potencial de equilíbrio do Na^+ e, em seguida, para baixo, em direção ao potencial de equilíbrio de K^+. **B.** As correntes através dos canais de Na^+ e K^+ constituem a base do potencial de ação. **C.** Os estados dos canais de Na^+ e K^+ durante o potencial de ação.

Agora estamos preparados para analisar o que acontece na geração de um potencial de ação (Figura 13.30). Inicialmente, um neurotransmissor, como a acetilcolina, é liberado de uma célula adjacente. A acetilcolina liberada liga-se ao receptor de acetilcolina, causando a sua abertura em menos de 1 ms. O receptor de acetilcolina é um canal de cátions inespecífico. Os íons sódio fluem para dentro da célula, enquanto os íons potássio fluem para fora. Sem quaisquer eventos adicionais, o potencial de membrana se moveria para um valor correspondente à média dos potenciais de equilíbrio do Na^+ e do K^+, de aproximadamente – 20 mV. Entretanto, quando o potencial de membrana aproxima-se de – 40 mV os "remos" sensíveis à voltagem dos canais de Na^+ são arrastados para dentro da membrana, abrindo os canais de Na^+. Com esses canais abertos, os íons

sódio fluem rapidamente para dentro da célula, e o potencial de membrana aumenta rapidamente em direção ao potencial de equilíbrio do Na^+. Os "remos" sensíveis à voltagem dos canais de K^+ também são arrastados para dentro da membrana pelo potencial de membrana modificado, porém mais lentamente do que os "remos" dos canais de Na^+. Todavia, depois de aproximadamente 1 ms, muitos canais de K^+ começam a se abrir. Ao mesmo tempo, o domínio de "bola" de inativação veda os canais abertos de Na^+, diminuindo a corrente desse íon. Os receptores de acetilcolina que iniciaram esses eventos também são inativados nessa escala de tempo. Com os canais de Na^+ inativados e apenas os canais de K^+ abertos, o potencial de membrana cai rapidamente em direção ao potencial de equilíbrio do K^+. Os canais abertos de K^+ são suscetíveis à inativação pelos seus domínios de "bola", e essas correntes de K^+ também são bloqueadas. Com o potencial de membrana se aproximando do seu valor inicial, os domínios de inativação são liberados, e os canais retornam a seu estado fechado original. Esses eventos propagam-se ao longo do neurônio, à medida que a despolarização da membrana abre os canais em setores adjacentes da membrana.

Quanta corrente realmente flui através da membrana durante um potencial de ação? Essa questão pode ser tratada a partir de duas direções complementares. Em primeiro lugar, uma célula nervosa típica contém 100 canais de Na^+ por micrômetro quadrado. Em um potencial de membrana de + 20 mV, cada canal conduz 10^7 íons por segundo. Por conseguinte, em um período de 1 ms, cerca de 10^5 íons fluem por cada micrômetro quadrado de superfície de membrana. Supondo um volume celular de 10^4 μm^3 e uma área de superfície de 10^4 μm^2, essa velocidade de fluxo iônico corresponde a um aumento na concentração de Na^+ de menos de 1%. Como isso pode ocorrer? Um forte potencial de ação é gerado, visto que o potencial de membrana é muito sensível até mesmo a uma discreta mudança na distribuição de cargas. Em virtude dessa sensibilidade, o potencial de ação constitui um mecanismo muito eficiente de sinalização por longas distâncias e com taxas rápidas de repetição.

O comprometimento da integridade dos canais iônicos por mutações ou substâncias químicas é potencialmente fatal

A geração de um potencial de ação exige a coordenação precisa de eventos reguladores de um conjunto de canais iônicos. A perturbação dessa sequência temporal de eventos pode ter efeitos devastadores. Por exemplo, a geração rítmica de potenciais de ação pelo coração é absolutamente essencial para manter o aporte de sangue oxigenado aos tecidos periféricos. A *síndrome do "QT" longo* (SQTL) é um distúrbio genético, em que ocorre retardo na recuperação do potencial de ação de seu potencial máximo para o potencial de equilíbrio de repouso. O termo "QT" refere-se a uma característica específica do padrão de atividade elétrica cardíaca, medido pelo eletrocardiograma. A SQTL pode resultar em breve perda da consciência (síncope), alteração do ritmo cardíaco normal (arritmia) e morte súbita. As mutações mais comuns identificadas em pacientes com SQTL inativam os canais de K^+ ou impedem o tráfego apropriado desses canais pela membrana plasmática. A consequente perda de permeabilidade ao potássio diminui a velocidade de repolarização da membrana e retarda a indução da contração cardíaca subsequente, tornando o tecido cardíaco suscetível a arritmias.

O prolongamento do potencial de ação cardíaco dessa maneira também pode ser induzido por vários agentes terapêuticos. Em particular, o canal de K^+ hERG [abreviatura para o gene humano relacionado com *ether-a-go-go* (*human ether-a-go-go-related gene*), assim designado pelo seu

ortólogo em *Drosophila melanogaster*] é altamente suscetível a interações com determinados fármacos. As regiões hidrofóbicas desses fármacos podem bloquear o hERG por meio de sua ligação a dois resíduos aromáticos não conservados na superfície interna da cavidade do canal. Além disso, acredita-se que essa cavidade seja mais larga que a de outros canais de K^+, devido à ausência de um motivo Pro-X-Pro conservado dentro do segmento hidrofóbico S6. A inibição do hERG por esses fármacos pode levar a um risco aumentado de arritmias cardíacas e morte súbita. Consequentemente, vários desses agentes foram retirados do mercado, como o anti-histamínico terfenadina. A triagem para a inibição do hERG constitui, hoje em dia, uma barreira importante de segurança para o avanço farmacêutico de uma molécula até ser aprovada como fármaco.

13.5 As junções comunicantes (*gap junctions*) possibilitam o fluxo de íons e pequenas moléculas entre células que se comunicam

Os canais iônicos que analisamos até agora apresentam poros estreitos e exibem seletividade moderada a alta pelos íons que conseguem passar por eles. Esses canais estão fechados no estado de repouso e têm um tempo de vida curto no estado aberto, tipicamente de 1 ms, o que possibilita a transmissão de sinais neurais com alta frequência. Consideremos agora um canal com função muito diferente. As junções comunicantes (*gap junctions*), também conhecidas como *canais intercelulares*, servem como vias de passagem no interior de células contíguas. As junções comunicantes aglomeram-se em regiões distintas das membranas plasmáticas de células justapostas. Micrografias eletrônicas de lâminas de junções comunicantes mostram que elas são estreitamente aglomeradas em uma disposição hexagonal regular (Figura 13.31). Um orifício central de 20 Å, o lúmen do canal, é proeminente em cada junção comunicante. Esses canais atravessam o espaço interposto ou lacuna entre células justapostas (explicando a expressão *gap junction*). A largura da lacuna entre os citoplasmas das duas células é de cerca de 35 Å.

Pequenas moléculas hidrofílicas, bem como íons, podem passar através das junções comunicantes. O tamanho do poro das junções foi determinado pela microinjeção de uma série de moléculas fluorescentes nas células e pela observação de sua passagem para as células adjacentes. Todas as moléculas polares com massa inferior a cerca de 1 kDa pode atravessar prontamente esses canais intercelulares. Por conseguinte, *os íons inorgânicos e a maioria dos metabólitos (p.ex., açúcares, aminoácidos e nucleotídios) podem fluir entre as partes internas das células unidas por junções comunicantes.* Em contrapartida, as proteínas, os ácidos nucleicos e os polissacarídios são demasiadamente grandes para atravessar esses canais. *As junções comunicantes são importantes para a comunicação intercelular.* As células de alguns tecidos excitáveis, como o músculo cardíaco, são acopladas pelo rápido fluxo de íons através dessas junções, o que assegura uma resposta rápida e sincronizada aos estímulos. As junções comunicantes também são essenciais para a nutrição das células que estão distantes dos vasos sanguíneos, como as da lente do olho e do osso. Além disso, os canais comunicantes são importantes no processo de desenvolvimento e diferenciação. Por exemplo, o útero quiescente transforma-se em um órgão de fortes contrações no início do trabalho de parto; a formação de junções comunicantes funcionais nessa ocasião cria um sincício de células musculares que se contraem de modo sincrônico.

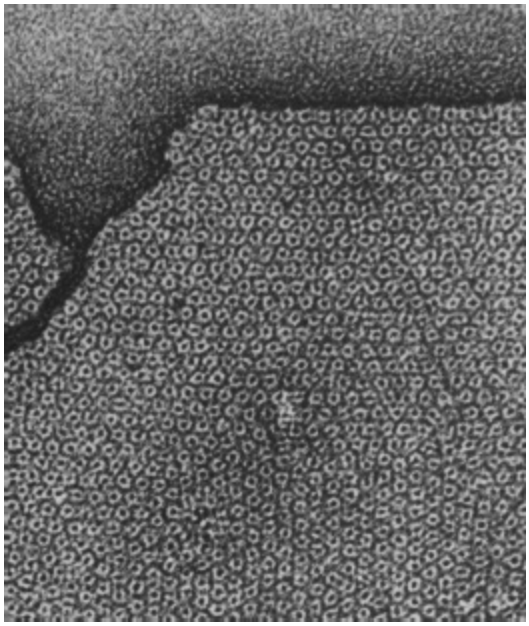


Figura 13.31 Junções comunicantes. Essa micrografia eletrônica mostra uma lâmina de junções comunicantes isoladas. Os conéxons cilíndricos formam uma rede hexagonal, com um comprimento celular unitário de 85 Å. O orifício central densamente corado tem cerca de 20 Å de diâmetro. [Don W. Fawcett/Photo Researchers.]

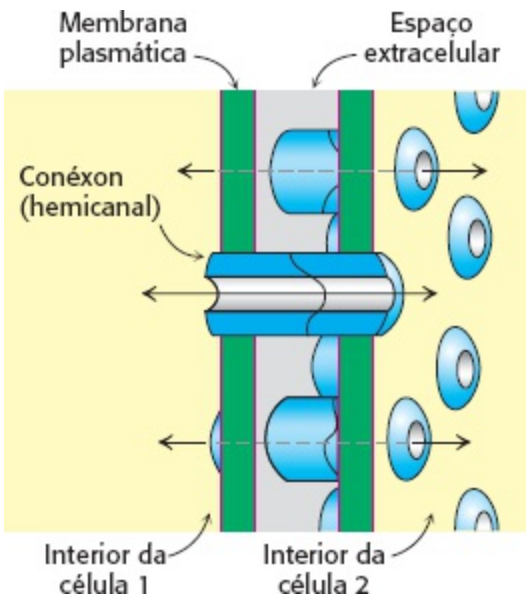


Figura 13.32 Representação esquemática de uma junção comunicante. [Cortesia do Dr. Werner Loewenstein.]

Um canal intercelular é constituído de 12 moléculas e de *conexina*, que pertence a uma família de proteínas transmembranares, com massas que variam de 30 a 42 kDa. Cada molécula de conexina parece ter quatro hélices que atravessam a membrana. Seis moléculas de conexina formam um arranjo hexagonal, criando meio canal, denominado conéxon ou hemicanal (Figura 13.32). Dois conéxons unem-se pelas suas extremidades no espaço intercelular, formando um canal funcional entre as células comunicantes. Os canais intercelulares diferem de outros canais de membrana em três aspectos: (1) atravessam duas membranas, em lugar de uma; (2) conectam o citoplasma de uma célula com o citoplasma de outra, em vez de conectar o citoplasma com o espaço extracelular ou o lúmen de uma organela; e (3) os conéxons que formam um canal são sintetizados por células diferentes. As junções comunicantes formam-se prontamente quando as células são reunidas. Uma vez formado, o canal intercelular tende a permanecer aberto por vários segundos a minutos. Fecham-se pelas altas concentrações de íons cálcio e pela presença de pH baixo. *O fechamento das junções comunicantes*

pelo Ca^{2+} e H^+ serve para isolar células normais de células adjacentes lesionadas ou mortas. As junções comunicantes também são controladas pelo potencial de membrana e por fosforilação induzida por hormônios.

O genoma humano codifica 21 conexinas distintas. Os diferentes membros dessa família são expressos em diferentes tecidos. Por exemplo, a conexina 26 é expressa em tecidos essenciais na orelha. Mutações nessa conexina estão associadas à surdez hereditária. A base mecânica para essa surdez parece consistir no transporte insuficiente de íons ou de moléculas de segundos mensageiros, como o insositol trifosfato, entre as células sensoriais.

13.6 Canais específicos aumentam a permeabilidade de algumas membranas à água

Uma importante classe de canais não tem nenhuma participação no transporte de íons. Na verdade, esses canais aumentam a velocidade com que a água flui através das membranas. Conforme assinalado no Capítulo 12, as membranas são razoavelmente permeáveis à água. Por que, então, são necessários canais específicos de água? Em certos tecidos, em algumas circunstâncias, é necessário haver um transporte rápido de água através das membranas. Por exemplo, nos rins, a água precisa ser rapidamente reabsorvida na corrente sanguínea após a filtração. De modo semelhante, na secreção de saliva e das lágrimas, a água precisa fluir rapidamente através das membranas. Essas observações sugeriram a existência de canais aquosos específicos, porém inicialmente não foi possível identificar esses canais.

Os canais (atualmente denominados *aquaporinas*) foram descobertos por acaso. Peter Agre assinalou a existência de uma proteína em altos níveis nas membranas dos eritrócitos, que não fora identificada porque não se corava bem com azul brilhante de Coomassie. Essa proteína foi encontrada em grandes quantidades nos eritrócitos, bem como em tecidos como os rins e a córnea, precisamente os tecidos que se acreditava que continham canais de água. Com base nessa observação, estudos posteriores foram planejados e revelaram que essa proteína de membrana de 24 kDa é, de fato, um canal de água.

A estrutura da aquaporina foi determinada (Figura 13.33). A proteína é constituída de seis α-hélices que atravessam a membrana. Duas alças contendo resíduos hidrofílicos revestem o canal propriamente dito. As moléculas de água passam através de uma única fila em uma velocidade de 10^6 moléculas por segundo. É importante ressaltar que resíduos específicos de carga positiva próximo ao centro do canal impedem o transporte de prótons através da aquaporina. Por conseguinte, os canais de aquaporina não rompem os gradientes de prótons, que desempenham papéis fundamentais na transdução da energia, como veremos no Capítulo 18. As aquaporinas revelam que podem surgir canais que especificamente não conduzem íons, como os outros que o fazem.

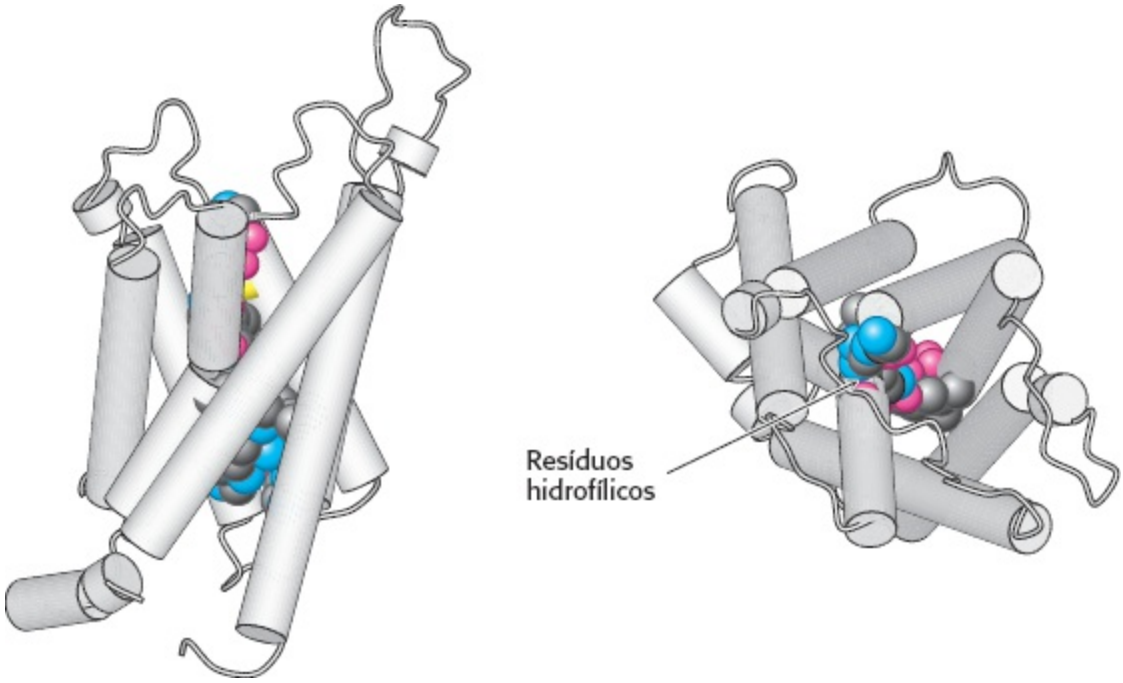


Figura 13.33 Estrutura da aquaporina. A estrutura da aquaporina vista de lado (à esquerda) e de cima (à direita). *Observe* os resíduos hidrofílicos (mostrados em modelos de preenchimento espacial) que revestem o canal de água. [Desenhada a partir de 1J4N.pdb.]

Resumo

13.1 O transporte de moléculas através de uma membrana pode ser ativo ou passivo

Para que ocorra um movimento efetivo de moléculas através de uma membrana, são necessárias duas características: (1) a molécula precisa ser capaz de atravessar uma barreira hidrofóbica e (2) o movimento deve ser acionado por uma fonte de energia. As moléculas lipofílicas podem passar pelo interior hidrofóbico de uma membrana por difusão simples. Essas moléculas se moverão ao longo de seus gradientes de concentração. As moléculas polares ou com carga elétrica necessitam de proteínas que formem passagens através da barreira hidrofóbica. Ocorrem transporte passivo ou difusão facilitada quando um íon ou uma molécula polar se movem ao longo de seu gradiente de concentração. Se a molécula se deslocar contra um gradiente de concentração, é necessária uma fonte de energia externa; esse movimento é designado como transporte ativo e resulta na geração de gradientes de concentração. O potencial eletroquímico mede a capacidade combinada de um gradiente de concentração e de uma distribuição desigual de carga elétrica de acionar substâncias através de uma membrana.

13.2 Duas famílias de proteínas de membrana utilizam a hidrólise do ATP para bombear íons e moléculas através das membranas

O transporte ativo é frequentemente realizado à custa da hidrólise do ATP. As ATPases do tipo P bombeiam íons contra um gradiente de concentração e tornam-se transitoriamente fosforiladas em um resíduo de ácido aspártico no processo de transporte. As ATPases do tipo P, que incluem a Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático e a Na^{+}–K^{+} ATPase, são proteínas integrais de membrana, com estruturas e mecanismos catalíticos conservados. As proteínas de membrana que contêm domínios de cassetes de ligação de ATP constituem outra família de bombas

dependentes de ATP. Cada bomba inclui quatro domínios principais: dois domínios que atravessam a membrana e dois outros que contêm estruturas de ABC ATPase com alça P. Essas bombas não são fosforiladas durante o bombeamento; na verdade, elas utilizam a energia de ligação e da hidrólise do ATP para acionar mudanças conformacionais que resultam no transporte de substratos específicos através das membranas. As proteínas de resistência a múltiplos fármacos conferem às células cancerosas resistência a fármacos ao bombearem agentes quimioterápicos para fora das células cancerosas antes que esses fármacos possam exercer seus efeitos.

13.3 Os transportadores secundários utilizam um gradiente de concentração para abastecer o próximo

Os carreadores são proteínas que transportam íons ou moléculas através da membrana sem a necessidade de hidrólise do ATP. Podem ser classificados em uniportadores, antiportadores e simportadores. Os uniportadores transportam um substrato em ambos os sentidos, sendo o sentido determinado pelas diferenças de concentração. Os antiportadores e os simportadores podem mediar o transporte ativo secundário ao acoplar o fluxo de um íon ou de uma molécula contra o gradiente de concentração ao fluxo de outro íon ou molécula a favor do gradiente de concentração. Os antiportadores acoplam o fluxo de um tipo de íon ao longo de um gradiente em um sentido com o fluxo de outro no sentido oposto contra um gradiente. Os simportadores movem ambos os íons no mesmo sentido. Estudos da lactose permease de *E. coli* elucidaram as estruturas e os mecanismos dos transportadores secundários.

13.4 Canais específicos podem rapidamente transportar íons através das membranas

Os canais iônicos possibilitam o movimento rápido de íons através da barreira hidrofóbica da membrana. A atividade individual de moléculas de canais iônicos pode ser observada pelo uso de técnicas de fixação de placas (*patch-clamp*). Muitos canais iônicos apresentam um arcabouço estrutural em comum. Em relação aos canais de K^+, os íons potássio hidratados precisam perder temporariamente suas moléculas de água coordenadas à medida que se movem para a parte mais estreita do canal, denominada filtro de seletividade. No filtro de seletividade, os grupos carbonílicos peptídicos coordenam os íons. O rápido fluxo de íons através do filtro de seletividade é facilitado pela repulsão entre íons, em que um íon empurra o seguinte através do canal. Alguns canais iônicos são regulados por voltagem: mudanças no potencial de membrana induzem mudanças conformacionais, que abrem esses canais. Muitos canais sofrem inativação espontânea após a sua abertura por um curto período de tempo. Em alguns casos, a inativação devese à ligação de um domínio do canal, denominado "bola" na entrada do canal, bloqueando-o. Outros canais, exemplificados pelo receptor de acetilcolina, são abertos ou fechados pela ligação de ligante. Os canais regulados por ligantes e aqueles regulados por voltagem trabalham em conjunto para gerar potenciais de ação. Mutações herdadas ou fármacos que interferem nos canais iônicos que produzem o potencial de ação podem resultar em distúrbios potencialmente fatais.

13.5 As junções comunicantes (*gap junctions*) possibilitam o fluxo de íons e pequenas moléculas entre células que se comunicam

Diferentemente de muitos canais, que conectam o interior da célula com o meio ambiente, as junções comunicantes (*gap junctions*), ou canais intercelulares, servem para conectar os interiores de células contíguas. Um canal intercelular é constituído de 12 moléculas de conexina, que se associam para formar dois conéxons de seis membros.

13.6 Canais específicos aumentam a permeabilidade de algumas membranas à água

Alguns tecidos contêm proteínas que aumentam a permeabilidade das membranas à água. Cada proteína formadora do canal de água, denominada aquaporina, é constituída de seis α-hélices que atravessam a membrana e de um canal central revestido com resíduos hidrofílicos, que possibilitam a passagem das moléculas de água em fila única. As aquaporinas não transportam prótons.

Palavras-chave

acetilcolina (p. 391)
antitransportador (simportador) (p. 382)
aquaporina (p. 396)
ATPase do tipo P (p. 376)
bomba (p. 373)
bomba acionada por ATP (p. 373)
bomba de Na^+–K^+ (Na^+–K^+ ATPase) (p. 376)
Ca^+ ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) (p. 376)
canal (p. 373)
canal iônico (p. 384)
canal regulado por ligante (p. 392)
canal regulado por voltagem (p. 389)
carreador (p. 373)
conéxon (hemicanal) (p. 396)
conexina (p. 396)
difusão facilitada (transporte passivo) (p. 373)
difusão simples (p. 374)
digitalina (p. 379)
domínio de cassete de ligação de ATP (ABC) (p. 380)
equação de Nernst (p. 393)
esteroide cardiotônico (p. 379)
eversão (p. 378)
fenda sináptica (p. 391)
filtro de seletividade (p. 387)
gigavedação (p. 385)
H^+–K^+ ATPase gástrica (p. 376)
impulso nervoso (p. 384)
junção comunicante (*gap junction*) (canais intercelulares) (p. 395)
lactose permease (p. 383)
modelo de bola e cadeia (p. 390)
neutrotransmissor (p. 391)
potencial de ação (p. 384)
potencial de equilíbrio (p. 393)
potencial eletroquímico (potencial de membrana) (p. 375)
proteína de resistência a múltiplos fármacos (MDR) (glicoproteína P) (p. 380)
receptor de acetilcolina (p. 391)

resistência a múltiplos fármacos (p. 380)
síndrome do QT longo (SQTL) (p. 394)
técnica de fixação de placas (*patch-clamp*) (p. 385)
transportador ABC (p. 380)
transportador secundário (cotransportador) (p. 382)
transporte ativo (p. 373)
transporte ativo primário (p. 373)
transporte ativo secundário (p. 373)
uniportador (p. 382)

Questões

1. *Oferecendo ajuda*. Diferencie a difusão simples da difusão facilitada.

2. *Acionando o movimento.* Quais são as duas formas de energia capazes de impulsionar o transporte ativo?

3. *Carreadores.* Cite os três tipos de proteínas carreadoras. Qual delas pode mediar o transporte ativo secundário?

4. *O preço da extrusão.* Qual é o custo de energia livre para o bombeamento do Ca^{2+} fora de uma célula quando a concentração citoplasmática é de 0,4 μM, a concentração extracelular é de 1,5 mM e o potencial de membrana é – 60 mV?

5. *Potenciais de equilíbrio*. Para uma célula de mamífero típica, as concentrações intracelular e extracelular do íon cloreto (Cl^-) são de 4 mM e 150 mM, respectivamente. Para o íon cálcio (Ca^{2+}), as concentrações intracelular e extracelular são de 0,2 μM e 1,8 mM, respectivamente. Calcule os potenciais de equilíbrio para esses dois íons a 37°C.

6. *Como ela é doce*. Algumas células animais captam a glicose por um simportador impulsionado pela entrada simultânea de Na^+. A entrada de Na^+ fornece a energia livre de 10,8 kJ mol^{-1} (2,6 kcal mol^{-1}) em condições celulares típicas ([Na^+] externa = 143 mM, [Na^+] interna = 14 mM, e potencial de membrana = – 50 mV). Qual é a concentração de glicose que pode ser gerada por essa entrada de energia livre?

7. *Variação sobre um tema*. Escreva um mecanismo detalhado para o transporte da Na^+–K^+ ATPase, com base na analogia com o mecanismo da Ca^{2+} ATPase mostrado na Figura 13.5.

8. *Bombeando prótons*. Planeje um experimento para mostrar que a ação da lactose permease pode ser revertida *in vitro* para bombear prótons.

9. *Abrindo canais.* Diferencie os canais regulados por ligantes dos canais regulados por voltagem.

10. *Diferentes sentidos*. O canal de K^+ e o canal de Na^+ têm estruturas semelhantes e estão dispostos na mesma orientação na membrana celular. Contudo, o canal de Na^+ possibilita o fluxo do íon sódio para dentro da célula, enquanto o canal de K^+ possibilita o fluxo de íons potássio para fora da célula.

11. *Diferentes mecanismos*. Distinga os mecanismos pelos quais os uniportadores e os canais transportam íon ou moléculas através da membrana.

12. *Curto-circuito*. O 4-(trifluorometóxi) carbonil cianeto fenil-hidrazona (FCCP) é um ionóforo de prótons: possibilita a passagem livre de prótons através das membranas. O tratamento de *E. coli* com FCCP impede o acúmulo de lactose nessas células. Explique.

13. *Trabalhando em conjunto*. O genoma humano contém mais de 20 genes que codificam conexinas. Vários desses genes são expressos em altos níveis no coração. Por que as conexinas são altamente expressas no tecido cardíaco?

14. *Relações de estrutura-atividade*. Com base na estrutura da tetrodotoxina, proponha um mecanismo pelo qual a toxina iniba o fluxo de Na^+ através do canal de Na^+.

15. *Boa mercadoria*. Quando a SERCA é incubada com [γ-^{32}P]ATP (uma forma de ATP em que o fosfato terminal é marcado com ^{32}P radioativo) e cálcio a 0°C durante 20 segundos e, em seguida, analisada por eletroforese em gel, observa-se uma banda radioativa no peso molecular que corresponde à SERCA de comprimento integral. Por que se observa uma banda marcada? Você esperaria observar uma banda semelhante se fizesse um ensaio semelhante, com um substrato apropriado, para a proteína MDR?

16. *Um caramujo perigoso*. Os caramujos do gênero *Conus* são carnívoros que injetam um poderoso conjunto de toxinas em sua presa, resultando em rápida paralisia. Foi constatado que muitas dessas toxinas se ligam a proteínas específicas de canais iônicos. Por que essas moléculas são tão tóxicas? Como essas toxinas poderiam ser úteis para estudos de bioquímica?

17. *Pausa para o efeito*. Imediatamente após a fase de repolarização de um potencial de ação, a membrana neuronal é temporariamente incapaz de responder ao estímulo de um segundo potencial de ação, um fenômeno designado como *período refratário*. Qual é a base do mecanismo do período refratário?

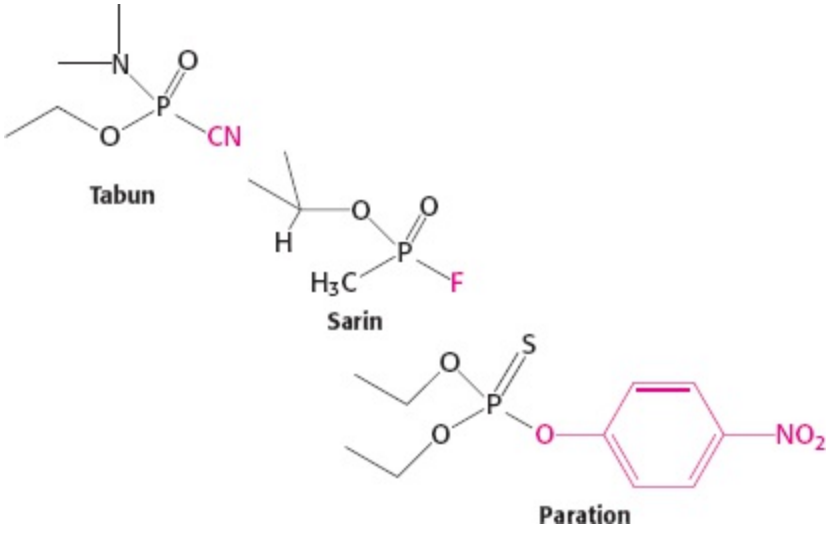
18. *Somente uns poucos*. Por que apenas um pequeno número de íons sódio precisa fluir através do canal de Na^+ para modificar significativamente o potencial de membrana?

19. *Mais de um mecanismo.* Como uma mutação em um canal de sódio cardíaco dependente de voltagem poderia provocar a síndrome do QT longo?

20. *Canais mecanossensíveis*. Muitas espécies contêm canais iônicos que respondem a estímulos mecanismos. Com base nas propriedades de outros canais iônicos, você esperaria que o fluxo de íons através de um único canal mecanossensível aberto aumentasse em resposta a um estímulo apropriado? Por que sim ou por que não?

21. *Abertura coordenada.* Suponha que um canal obedeça o modelo alostérico concertado ou coordenado (modelo MWC, Seção 7.2). A ligação do ligante ao estado R (a forma aberta) é 20 vezes mais firme que a ligação ao estado T (a forma fechada). Na ausência de ligante, a razão entre canais fechados e abertos é de 10^5. Se o canal for um tetrâmero, qual será a fração de canais abertos quando 1, 2, 3 e 4 ligantes estiverem ligados?

22. *Paralisia respiratória*. O neurotransmissor acetilcolina é degradado por uma enzima específica, que é inativada por tabun, sarin e paration. Com base nas seguintes estruturas, proponha uma base possível para as suas ações letais.



23. *Abertura de canal induzida por ligante*. A razão entre as formas abertas e fechadas do canal do receptor de acetilcolina contendo uma e duas moléculas de acetilcolina ligadas é 5×10^{-6}, $1{,}2 \times 10^{-3}$ e 14, respectivamente.

(a) Por qual fator a razão entre forma aberta e fechada é aumentada pela ligação da primeira molécula de acetilcolina? E pela segunda molécula?

(b) Quais são as contribuições correspondentes de energia livre para a abertura do canal a 25°C?

(c) A transição alostérica pode ser explicada pelo modelo coordenado MWC (Seção 7.2)?

24. *Veneno de rã*. A batraquiotoxina (BTX) é um alcaloide esteroide da pele de *Phyllobates terribilis*, uma rã colombiana venenosa (a fonte do veneno usado em dardos de zarabatanas). Na presença de BTX, os canais Na^+ em uma placa excisada permanecem persistentemente abertos quando a membrana é despolarizada. Fecham-se com a repolarização da membrana. Que transição é bloqueada pela BTX?

25. *Alvo do Valium®*. O ácido γ-aminobutírico (GABA) abre canais que são específicos para íons cloreto. O canal do receptor $GABA_A$ é farmacologicamente importante, visto que constitui o alvo do Valium®, que é utilizado para diminuir a ansiedade.

(a) A concentração extracelular de Cl^- é de 123 mM e a concentração intracelular é de 4 mM. Em que sentido o Cl^- flui através de um canal aberto quando o potencial de membrana encontra-se na faixa de –60 mV a + 30 mV?

(b) Qual é o efeito da abertura do canal de Cl^- na excitabilidade de um neurônio?

(c) O perfil hidropático do receptor de $GABA_A$ assemelhase ao do receptor de acetilcolina. Preveja o número de subunidades neste canal de Cl^-.

26. *Entendendo a SERCA*. Para estudar o mecanismo da SERCA, você prepara vesículas de membrana contendo essa proteína orientada de tal modo que o seu sítio de ligação ao ATP esteja na superfície externa da vesícula. Para medir a atividade da bomba, você utiliza um ensaio que detecta a formação de fosfato inorgânico no meio. Quando você adiciona cálcio e ATP ao meio, observa a produção de fosfato apenas por um curto período de tempo. Somente após a adição de calcimicina, uma molécula que torna as membranas seletivamente permeáveis ao cálcio, é que você observa a

produção sustentada de fosfato. Explique.

Questão | Integração de capítulos

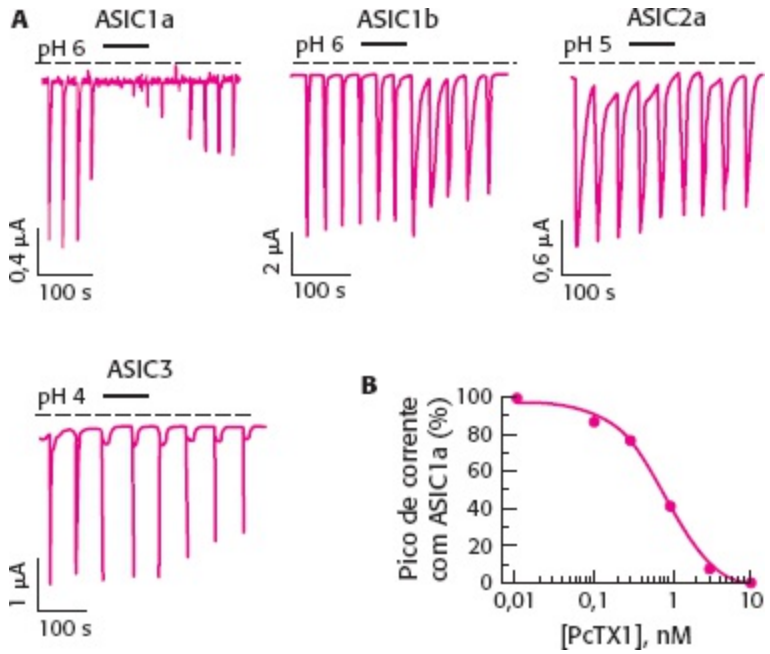
27. *Questão de velocidade e de eficiência*. A acetilcolina é rapidamente destruída pela enzima acetilcolinesterase. Essa enzima que tem um número de renovação de 25.000 por segundo alcançou a perfeição catalítica com k_{cat}/K_M de 2×10^8 $M^{-1}s^{-1}$. Por que a eficiência dessa enzima é fisiologicamente crucial?

Questões sobre mecanismo

28. *Recordação de mecanismos passados*. A acetilcolinesterase converte a acetilcolina em acetato e colina. À semelhança das serina proteases, a acetilcolinesterase é inibida por DIPF. Proponha um mecanismo catalítico para a digestão da acetilcolina pela acetilcolinesterase. Mostre a reação na forma de estruturas químicas.

Questões | Interpretação de dados

29. *Toxina da tarântula.* A sensação de ácido está associada à dor, ao paladar e a outras atividades biológicas (Capítulo 33). A sensação de ácido deve-se a um canal regulado por ligante, que possibilita o influxo de Na^+ em resposta ao H^+. Essa família de canais iônicos sensíveis ao ácido (ASIC) é constituída de diversos membros. A psalmotoxina 1 (PcTX1), um veneno da tarântula inibe alguns membros dessa família. Os seguintes registros eletrofisiológicos de células contendo vários membros da família ASIC foram feitos na presença da toxina em uma concentração de 10 nM. Os canais foram abertos pela mudança do pH de 7,4 para os valores indicados. A PcTX1 esteve presente por um curto período de tempo (indicado pela barra preta acima dos registros), quando foi rapidamente removida do sistema.



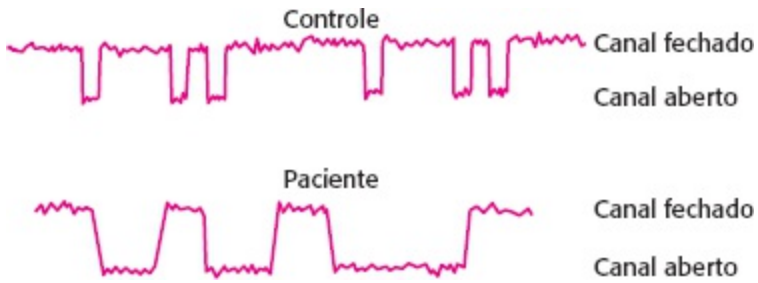
A. Registros eletrofisiológicos de células expostas à toxina de tarântula.
B. Gráfico do pico de corrente de uma célula contendo a proteína ASIC1a *versus* a concentração da toxina. [De P. Escoubas *et al. J. Biol. Chem*. 275(2000):25116-25121.]

(a) Qual dos membros da família ASIC – ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a ou ASIC3 – é mais sensível a toxina?

(b) O efeito da toxina é reversível? Explique.

(c) Qual a concentração de PcTX1 que produz 50% de inibição do canal sensível?

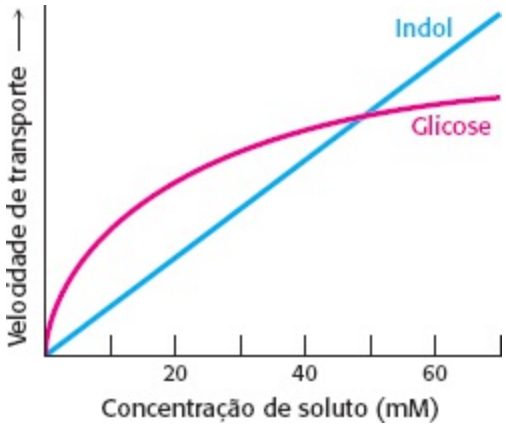
30. *Problemas de canal 1*. Diversas condições patológicas resultam de mutações no canal do receptor de acetilcolina. Uma das mutações na subunidade β, βV266M, provoca fraqueza muscular e fadiga rápida. Uma investigação das correntes geradas pela acetilcolina através do canal do receptor de acetilcolina para um controle e um paciente produziu os seguintes resultados.



Qual é o efeito da mutação sobre a função do canal? Sugira algumas explicações bioquímicas possíveis para o efeito.

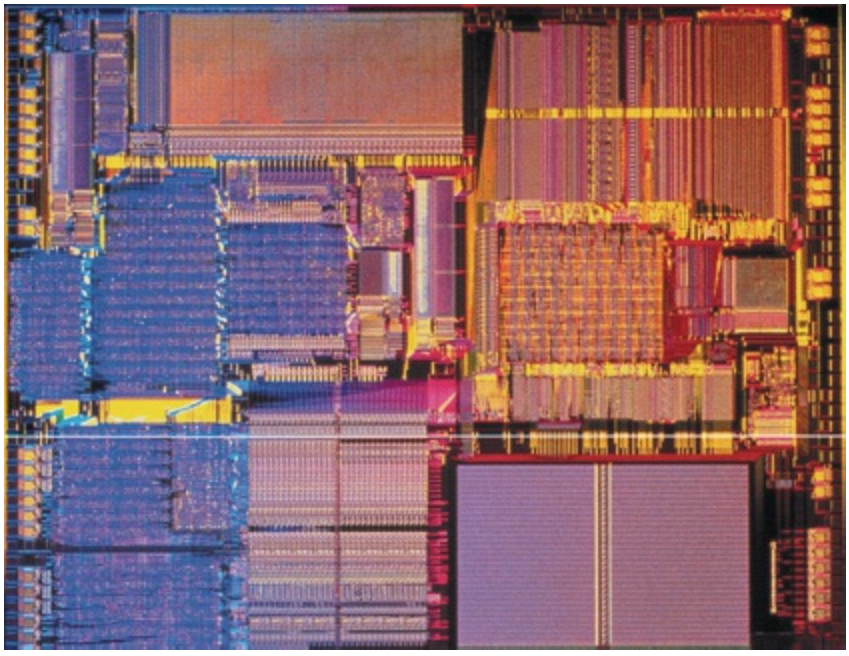
31. *Problemas de canal 2.* O canal do receptor de acetilcolina também pode sofrer mutação que leva à síndrome do canal rápido (FCS, do inglês *fast-channel syndrome*), com manifestações clínicas semelhantes àquelas da síndrome do canal lento (SCS, do inglês *slow-channel syndrome*). Como seriam os registros do movimento iônico nessa síndrome? Sugira uma explicação bioquímica.

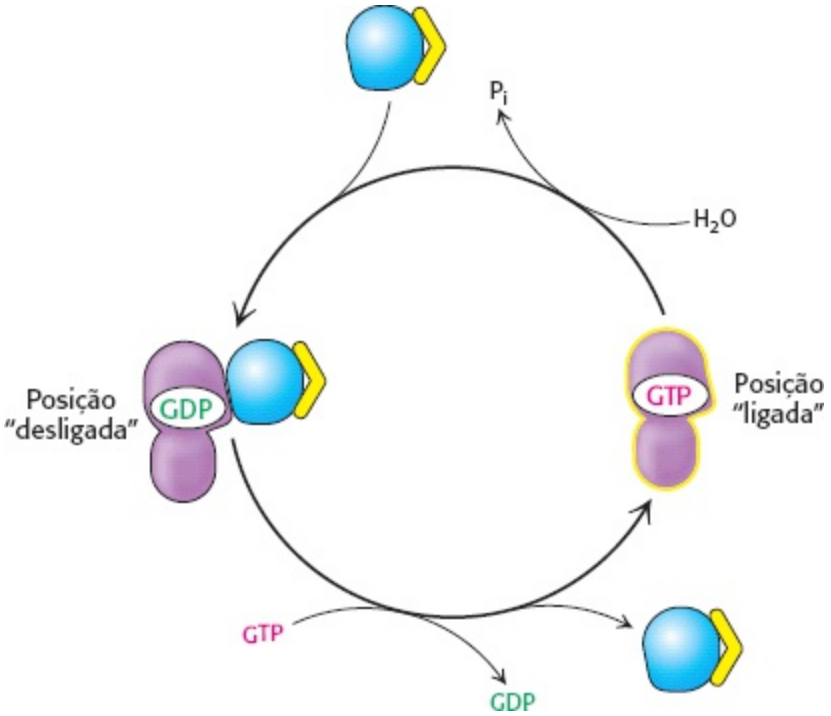
32. *Diferenças de transporte*. A velocidade de transporte de duas moléculas indol e glicose através de uma membrana é mostrada a seguir. Quais são as diferenças entre os mecanismos de transporte das duas moléculas? Suponha que a ouabaína iniba o transporte de glicose. O que essa inibição poderia sugerir sobre o mecanismo de transporte?



Vias de Transdução de Sinais

14





Os circuitos de transdução de sinais nos sistemas biológicos apresentam interruptores moleculares que, à semelhança daqueles em um *chip* de computador (acima), transmitem a informação quando ligados. Entre esses circuitos, são comuns os que incluem as proteínas G (à direita), que transmitem um sinal quando ligadas ao GTP e são silenciosas quando ligadas ao GDP. [Fotografia à esquerda, cortesia de Intel.]

SUMÁRIO

14.1 As proteínas G heterotriméricas transmitem sinais e se restabelecem

14.2 Sinalização da insulina | As cascatas de fosforilação são fundamentais para muitos processos de transdução de sinais

14.3 Sinalização do EGF | As vias de transdução de sinais são preparadas para responder

14.4 Muitos elementos reaparecem com variações em diferentes vias de transdução de sinais

14.5 Defeitos nas vias de transdução de sinais podem levar ao câncer e a outras doenças

Uma célula é altamente responsiva a substâncias químicas específicas existentes em seu ambiente: ela pode adaptar o seu metabolismo ou alterar padrões de expressão gênica ao perceber a sua presença. Nos organismos multicelulares, esses sinais químicos são cruciais para coordenar as respostas fisiológicas (Figura 14.1). Três exemplos de sinais moleculares que estimulam uma resposta fisiológica são a epinefrina (algumas vezes denominada adrenalina), a insulina e o fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês *epidermal growth factor*). Quando um mamífero é ameaçado, suas glândulas suprarrenais liberam o hormônio epinefrina, que estimula a mobilização das reservas de energia e leva a uma melhora da função cardíaca. Depois de uma refeição, as células β do pâncreas liberam insulina, que estimula numerosas respostas fisiológicas, incluindo a captação de glicose a partir da corrente sanguínea e o seu armazenamento na forma de glicogênio. A liberação do EGF em resposta a um ferimento estimula o crescimento e a divisão de células específicas. Em todos esses casos, a célula recebe informações de que determinada molécula está presente em seu ambiente acima de alguma concentração limiar. A cadeia de eventos que transforma a mensagem "esta molécula está presente" na resposta fisiológica final é denominada *transdução de sinal*.

As vias de transdução de sinais frequentemente são constituídas por muitos componentes e ramificações. Por conseguinte, podem ser extremamente complicadas e confusas. Entretanto, é possível revelar a lógica da transdução de sinais ao examinar estratégias comuns e classes de moléculas que se repetem nessas vias. Esses princípios serão introduzidos aqui, visto que as vias de transdução de sinais afetam praticamente todas as vias metabólicas que analisaremos no restante do livro.

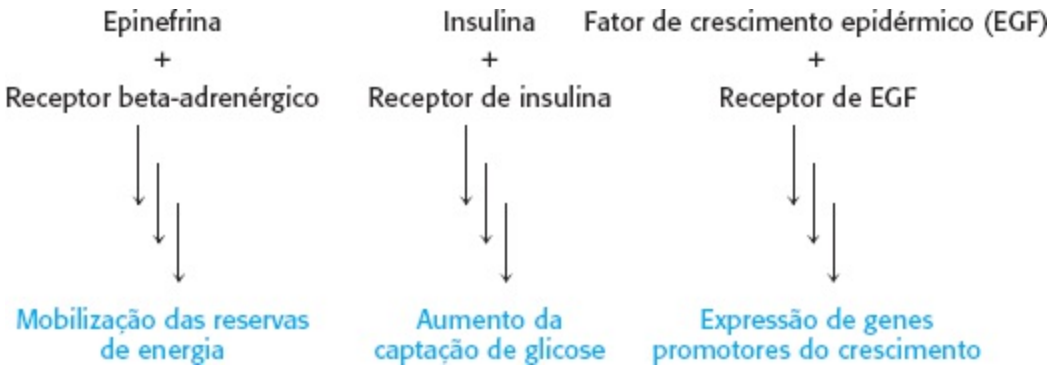


Figura 14.1 Três vias de transdução de sinais. A ligação de moléculas de sinalização a seus receptores dá início a vias que levam a respostas fisiológicas importantes.

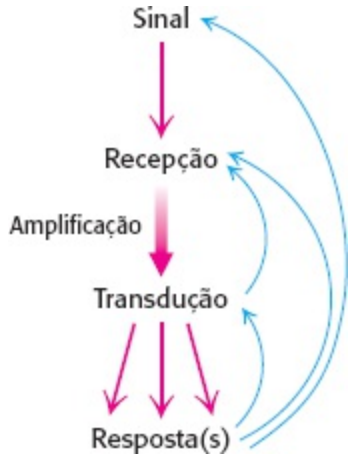


Figura 14.2 Princípios da transdução de sinais. Um sinal do ambiente é inicialmente recebido pela sua interação com um componente celular, mais frequentemente um receptor de superfície celular. A informação de que o sinal chegou é então convertida em outras formas químicas ou transduzida. O processo de transdução frequentemente compreende muitas etapas. Com frequência, o sinal é amplificado antes de produzir uma resposta. Todo o processo de sinalização é regulado por vias de retroalimentação.

A transdução de sinais depende de circuitos moleculares

As vias de transdução de sinais seguem um curso amplamente semelhante, que pode ser considerado como um circuito molecular (Figura 14.2). Todos esses circuitos contêm certas etapas fundamentais:

1. *Liberação do primeiro mensageiro*. Um estímulo, como a ocorrência de um ferimento ou uma refeição digerida, desencadeia a liberação da molécula de sinalização, também denominada primeiro mensageiro.

2. *Recepção do primeiro mensageiro*. A maioria das moléculas sinalizadoras não entra nas células. Com efeito, as proteínas na membrana celular atuam como *receptores*, que se ligam às moléculas sinalizadoras e transferem a informação da molécula ligada do ambiente para o interior da célula. Os receptores estendem-se pela membrana celular e, portanto, apresentam componentes tanto extracelulares quanto intracelulares. Um sítio de ligação no lado extracelular reconhece especificamente a molécula de sinalização (frequentemente designada como ligante). Esses sítios de ligação são análogos aos sítios ativos das enzimas, exceto que não ocorre catálise dentro deles. A interação do ligante com o receptor altera a estrutura terciária ou quaternária do receptor, induzindo uma mudança estrutural no lado intracelular.

3. *Entrega da mensagem no interior da célula pelo segundo mensageiro*. Outras moléculas pequenas, denominadas segundos mensageiros, são utilizadas para retransmitir a informação dos complexos receptor-ligante. Os segundos mensageiros são moléculas intracelulares cuja concentração varia em resposta a sinais do ambiente e que medeiam a etapa seguinte no circuito de informação molecular. Alguns segundos mensageiros particularmente importantes são o AMP cíclico (cAMP) e o GMP cíclico (cGMP), o íon cálcio, o inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol (DAG; Figura 14.3).

A utilização de segundos mensageiros tem várias consequências. Na primeira, o sinal pode ser amplificado significativamente na geração dos segundos mensageiros. Apenas um pequeno número de

moléculas receptoras podem ser ativadas pela ligação direta de moléculas sinalizadoras, porém cada molécula de receptor ativada pode levar à geração de muitos segundos mensageiros. Por conseguinte, *uma baixa concentração de sinal no ambiente, até mesmo de uma única molécula, pode produzir grande sinal e grande resposta intracelulares*. Como segunda consequência, os segundos mensageiros frequentemente estão livres para sofrer difusão para outros compartimentos da célula, onde podem influenciar processos por toda a célula. Por fim, o uso de segundos mensageiros comuns em múltiplas vias de sinalização cria tanto oportunidades quanto problemas potenciais. A entrada (*input*) de várias vias de sinalização, frequentemente denominada *comunicação cruzada*, pode alterar a concentração de um segundo mensageiro comum. A comunicação cruzada possibilita uma regulação mais precisa da atividade celular do que teriam as ações de vias individuais independentes. Entretanto, uma comunicação cruzada inadequada pode resultar em interpretação incorreta de variações na concentração de segundos mensageiros.

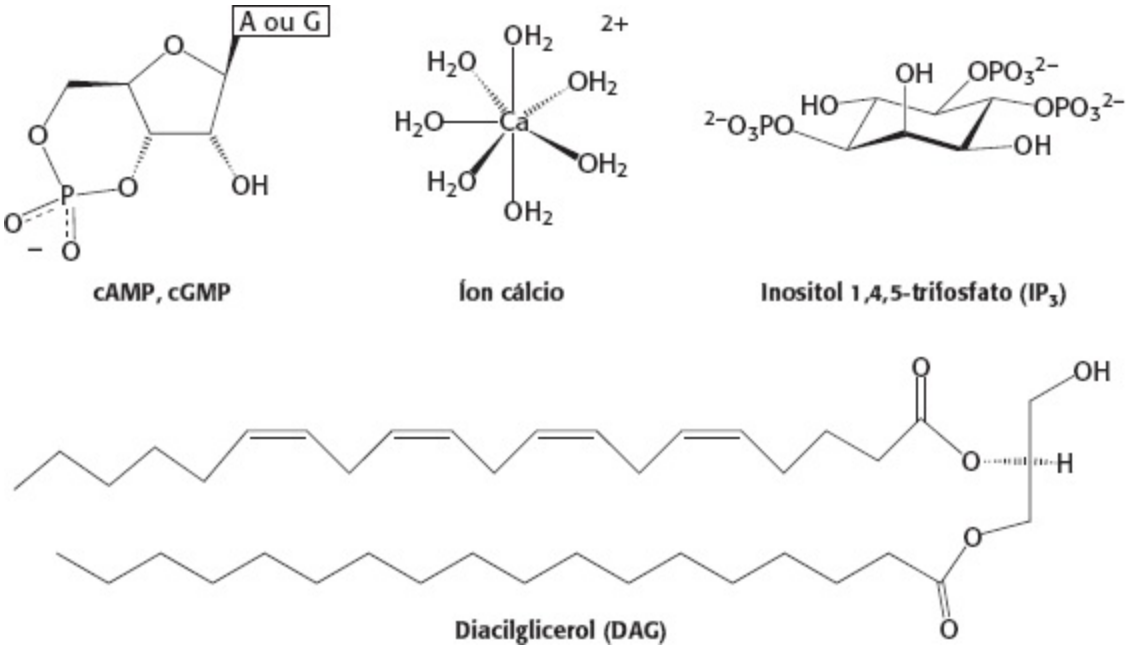


Figura 14.3 Segundos mensageiros comuns. Os segundos mensageiros são moléculas intracelulares cuja concentração varia em resposta a sinais do ambiente. Essa alteração na concentração transmite a informação para dentro da célula.

4. *Ativação de efetores que alteram diretamente a resposta fisiológica*. O efeito final da via de sinalização consiste em ativar (ao inibir) as bombas, os canais, as enzimas e os fatores de transcrição que controlam diretamente as vias metabólicas, a expressão gênica e a permeabilidade das membranas a íons específicos.

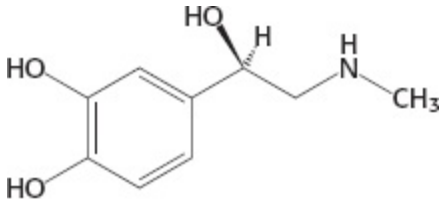
5. *Terminação do sinal*. Após uma célula ter completado a sua resposta a determinado sinal, o processo de sinalização precisa ser concluído, ou a célula perderá a sua capacidade de responder a novos sinais. Além disso, os processos de sinalização que deixam de terminar de modo adequado podem ter consequências altamente indesejáveis. Como veremos adiante, muitos tipos de câncer estão associados a processos de transdução de sinais que não são apropriadamente concluídos, particularmente processos que controlam o crescimento celular.

Neste capítulo, examinaremos os componentes das três vias de transdução de sinais apresentadas

na Figura 14.1. Veremos, com isso, diversas classes de domínios adaptadores presentes nas proteínas de transdução de sinais. Esses domínios reconhecem habitualmente classes específicas de moléculas e ajudam a transferir a informação de uma proteína para outra. Os componentes descritos no contexto destas três vias repetem-se em muitas outras vias de transdução de sinais, de modo que é importante ter em mente que os exemplos específicos são representativos de muitas dessas vias.

14.1 As proteínas G heterotriméricas transmitem sinais e se restabelecem

A epinefrina é um hormônio secretado pelas glândulas suprarrenais dos mamíferos em resposta a estressores internos e externos. A epinefrina exerce uma ampla variedade de efeitos – designados como resposta de "luta ou fuga" – para ajudar o organismo a antecipar a necessidade de rápida atividade muscular, incluindo aceleração da frequência cardíaca, dilatação do músculo liso das vias respiratórias e iniciação da degradação do glicogênio (Seção 21.3) e dos ácidos graxos (Seção 22.2). A sinalização da epinefrina começa com a ligação do ligante a uma proteína denominada *receptor* betaadrenérgico (β-AR). O β-AR é um membro da maior classe de receptores de superfície celular, denominados *receptores com sete hélices transmembrânicas* (7TM). Os membros dessa família são responsáveis por transmitir a informação iniciada por sinais tão diversos como hormônios, neurotransmissores, substâncias odoríferas, sabores e até mesmo fótons (Tabela 14.1). Atualmente são conhecidos mais de 20.000 desses receptores. Além disso, cerca de um terço dos fármacos que usamos tem como alvos receptores dessa classe. Como o próprio nome indica, esses receptores contêm sete hélices que atravessam a bicamada da membrana de um lado ao outro. Algumas vezes, os receptores são designados como *receptores serpentinos*, visto que a única cadeia polipeptídica "serpenteia" sete vezes pela membrana (Figura 14.4).



Epinefrina

Tabela 14.1 Funções biológicas mediadas por receptores 7TM.

Ação hormonal
Secreção hormonal
Neurotransmissão
Quimiotaxia
Exocitose
Controle da pressão arterial
Embriogênese

Crescimento e diferenciação celulares
Desenvolvimento
Olfato
Paladar
Visão
Infecção viral

Fonte: J. S. Gutkind, J. Biol. *Chem.* 273:1839-1842, 1998.

O primeiro membro da família dos receptores 7TM a ter a sua estrutura tridimensional determinada foi a *rodopsina* (Figura 14.5A), uma proteína da retina do olho, que percebe a presença de fótons e que inicia a cascata de sinalização responsável pela visão. Um único resíduo de lisina na rodopsina é modificado covalentemente por uma forma de vitamina A, o 11-*cis*-retinal. Essa modificação está localizada perto do lado extracelular do receptor, dentro da região circundada pelas sete hélices transmembrânicas. Como veremos com mais detalhes na Seção 33.3, a exposição à luz induz a isomerização do 11-*cis*-retinal em sua forma holo-*trans*, produzindo uma mudança estrutural do receptor, que resulta no desencadeamento de um potencial de ação, que é finalmente interpretado pelo cérebro como estímulo visual.

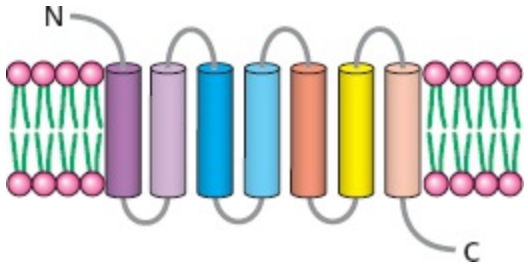


Figura 14.4 Receptor 7TM. Representação esquemática de um receptor 7TM, mostrando a sua passagem pela membrana sete vezes.

Em 2007, a estrutura tridimensional do subtipo β_2 do receptor adrenérgico (β_2-AR) humano ligado ao inibidor foi resolvida por cristalografia de raios X. Esse inibidor, o carazolol, compete com a epinefrina pela sua ligação ao β_2-AR, de modo muito semelhante aos inibidores competitivos que atuam em sítios ativos das enzimas (Seção 8.5). A estrutura do β_2-AR revelou ter uma considerável semelhança com a da rodopsina, particularmente no que concerne à localização do 11-*cis*-retinal na rodopsina e do sítio de ligação do carazolol (Figura 14.5B). Embora ainda não tenham sido estabelecidos os detalhes precisos da mudança conformacional induzida pela ligação do ligante ao β-AR, a epinefrina provavelmente se liga ao β-AR em uma região semelhante do receptor ao qual se liga o carazolol, desencadeando mudanças conformacionais nas partes citoplasmáticas do β-AR, comparáveis àquelas induzidas pela isomerização na rodopsina da retina. Por conseguinte, a ligação de um ligante do lado extracelular induz um rearranjo estrutural na parte do receptor 7TM que está posicionada dentro da célula.

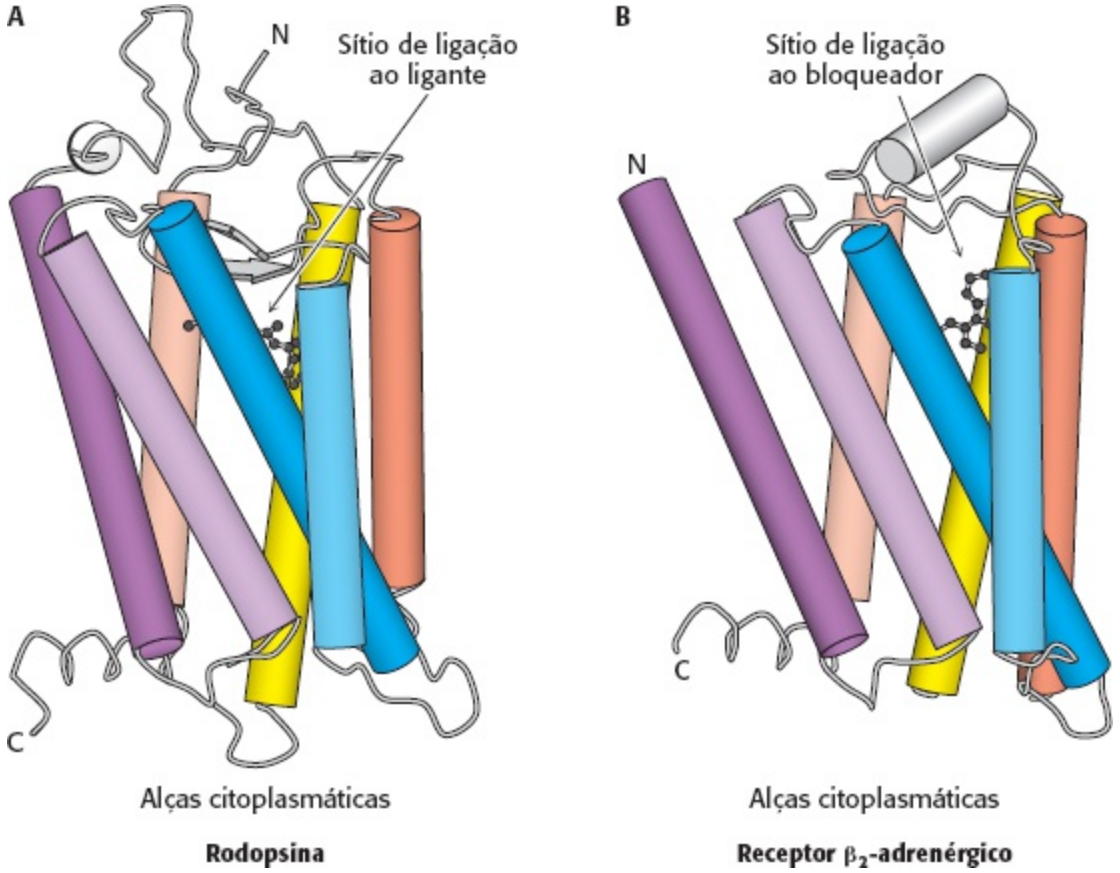


Figura 14.5 Estruturas da rodopsina e do receptor β_2-adrenérgico. Estrutura tridimensional da rodopsina (**A**) e do receptor β_2-adrenérgico (**B**). *Observe* a semelhança na arquitetura global de ambos os receptores e as localizações semelhantes do ligante de rodopsina, 11-*cis*-retinal e do bloqueador β_2-AR, carazolol. [Desenhada a partir de 1F88.pdb e 2RH1.pdb.]

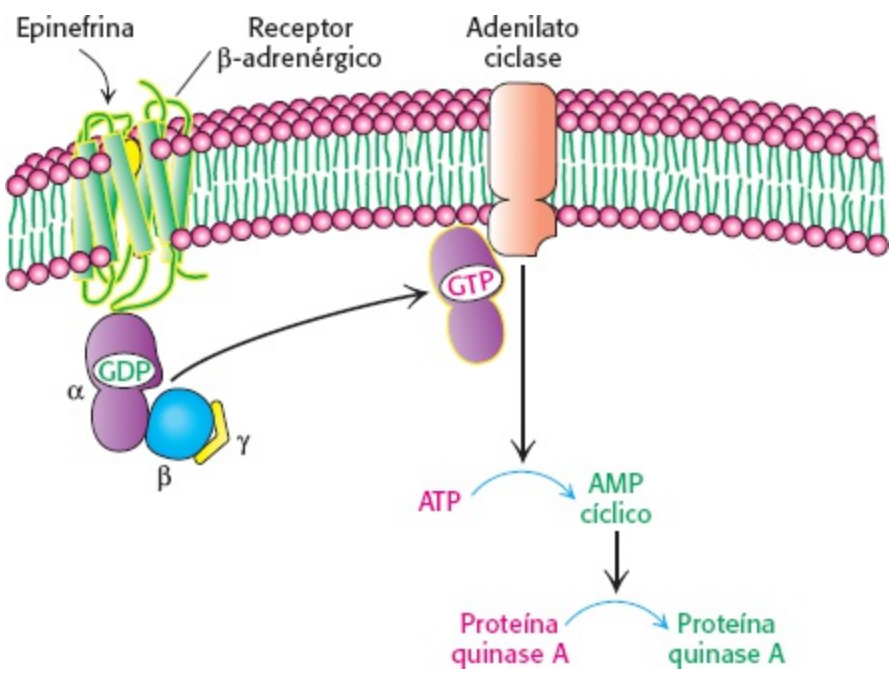


Figura 14.6 Ativação da proteína quinase A por uma via de proteína G. A ligação do hormônio a um receptor 7TM inicia uma via de transdução de sinal, que atua por meio de uma proteína G e do cAMP para ativar a proteína quinase A.

A ligação do ligante aos receptores 7TM leva à ativação de proteínas G heterotriméricas

Qual é a etapa seguinte da via? A mudança conformacional do domínio citoplasmático do receptor ativa uma proteína, denominada *proteína* G, em virtude de sua ligação a guanil nucleotídios. A

proteína G ativada estimula a atividade da adenilato ciclase, uma enzima que catalisa a conversão do ATP em cAMP. A proteína G e a adenilato ciclase permanecem fixadas à membrana, enquanto o cAMP pode percorrer toda a célula transportando o sinal originalmente produzido pela ligação da epinefrina. A Figura 14.6 fornece uma ampla visão geral dessas etapas.

Consideremos agora, com mais detalhes, o papel da proteína G nessa via de sinalização. Em seu estado inativado, a proteína G está ligada ao GDP. Nesta forma, a proteína G existe como um heterotrímero, constituído de subunidades α, β e γ; a subunidade α (designada como G_α) liga-se ao nucleotídio (Figura 14.7). A subunidade α é um membro da família de NTPase com alça P (Seção 9.4), e a alça P participa na ligação ao nucleotídio. As subunidades α e γ estão habitualmente ancoradas à membrana por ácidos graxos ligados covalentemente. *O papel do receptor ligado ao hormônio consiste em catalisar a troca de GTP pelo GDP ligado.* O complexo hormônio-receptor interage com o heterotrímero da proteína G e abre o sítio de ligação do nucleotídio, de modo que o GTP na célula possa deslocar o GDP.

Com a ligação do GTP, a subunidade α dissocia-se simultaneamente do dímero βγ ($G_{\beta\gamma}$), transmitindo o sinal de que o receptor está ligado a seu ligante. *Um único complexo hormônio-receptor pode estimular a troca de nucleotídios em muitos heterotrímeros de proteína G.* Por conseguinte, centenas de moléculas de G_α são convertidas de sua forma com GDP em sua forma com GTP para cada molécula de hormônio ligada, produzindo uma resposta amplificada. Como eles sinalizam por meio das proteínas G, os receptores 7TM são frequentemente denominados *receptores acoplados à proteína G* (GPCR).

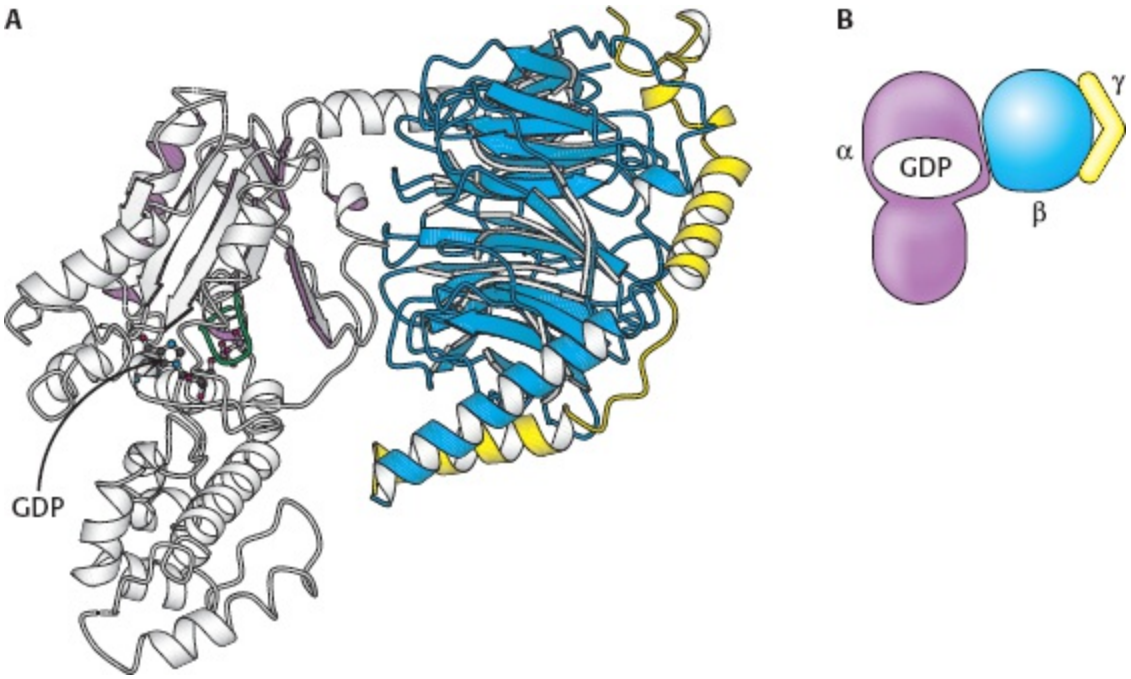


Figura 14.7 Proteína G heterotrimérica. **A.** Um diagrama em fitas mostra a relação entre as três subunidades. Nesse complexo, a subunidade α (cinza e violeta) está ligada ao GDP. *Observe* que o GDP está ligado em uma bolsa próxima à superfície onde a subunidade α interage com o dímero βγ. **B.** Representação esquemática da proteína G heterotrimérica. [Desenhada a partir de 1GOT.pdb.]

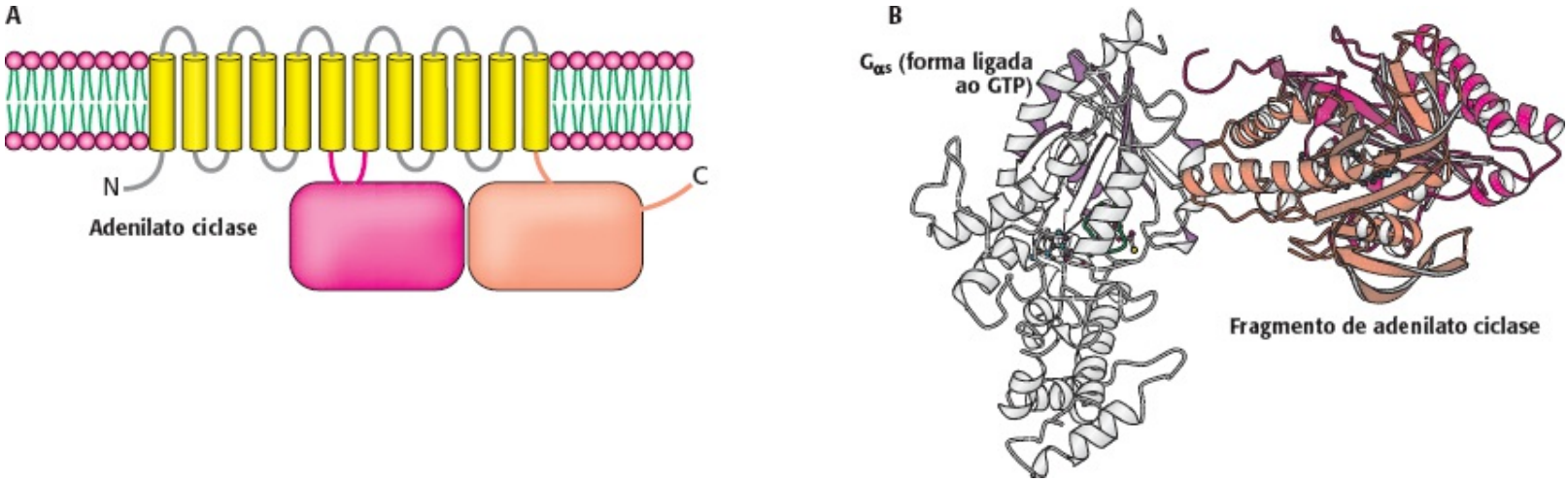


Figura 14.8 Ativação da adenilato ciclase. A. A adenilato ciclase é uma proteína de membrana com dois grandes domínios intracelulares, que contêm o aparelho catalítico. **B.** A estrutura de um complexo entre entre G_{α}, em sua forma com GTP ligado, a um fragmento catalítico da adenilato ciclase. *Observe* que a superfície de Gα que estava ligada ao dímero βγ liga-se agora à adenilato ciclase. [Desenhada a partir de 1AZS.pdb.]

As proteínas G ativadas transmitem sinais por meio de sua ligação a outras proteínas

Na forma com GTP, a superfície de G_{α} que estava ligada ao $G_{\beta\gamma}$ modificou a sua conformação da forma com GDP, de modo que ela não tem mais uma alta afinidade por $G_{\beta\gamma}$. Essa superfície está agora exposta para a sua ligação a outras proteínas. Na via β-AR, o novo parceiro de ligação é a *adenilato ciclase*, a enzima que converte o ATP em cAMP. Essa enzima é uma proteína de membrana que contém 12 hélices transmembrânicas; dois grandes domínios citoplasmáticos formam a parte catalítica da enzima (Figura 14.8). A interação de G_{α} com a adenilato ciclase favorece uma conformação cataliticamente mais ativa da enzima, estimulando, assim, a produção de cAMP. De fato, a subunidade G_{α} que participa na via do β-AR é denominada $G_{\alpha s}$ ("s" refere-se a "estimuladora", do inglês *stimulatory*). *O resultado final é que a ligação da epinefrina ao receptor na superfície celular aumenta a taxa de produção de cAMP dentro da célula.* A produção de cAMP pela adenilato ciclase fornece um segundo nível de amplificação, visto que cada adenilato ciclase ativada pode converter muitas moléculas de ATP em cAMP.

O AMP cíclico estimula a fosforilação de muitas proteínas-alvo ao ativar a proteína quinase A

A concentração aumentada de cAMP pode afetar uma ampla variedade de processos celulares. No músculo, o cAMP estimula a produção de ATP para a contração muscular. Em outros tipos celulares, o cAMP aumenta a degradação de substratos energéticos armazenados, aumenta a secreção de ácido pela mucosa gástrica, leva à dispersão dos grânulos do pigmento melanina, diminui a agregação das plaquetas sanguíneas e induz a abertura dos canais de cloreto. Como o cAMP influencia tantos processos celulares? *Os efeitos do cAMP nas células eucarióticas são mediados, em sua maioria, pela ativação de uma única proteina quinase.* Essa enzima fundamental *é a proteína quinase A* (PKA).

Figura 14.9 Via de sinalização da epinefrina. A ligação da epinefrina ao receptor beta-adrenérgico inicia a via de transdução de sinais. O processo de cada etapa está indicado (em preto) à esquerda de cada seta. As etapas que têm o potencial de amplificação do sinal estão indicadas em verde, à direita.

Conforme descrito anteriormente, a PKA é constituída de duas cadeias regulatórias (R) e duas cadeias catalíticas (C) (ver Figura 10.17). Na ausência de cAMP, o complexo R_2C_2 é cataliticamente inativo. A ligação do cAMP às cadeias regulatórias libera as cadeias catalíticas, que são, por si sós, cataliticamente ativas. Em seguida, a PKA ativada fosforila resíduos específicos de serina e de treonina em muitos alvos, alterando a sua atividade. Por exemplo, a PKA fosforila duas enzimas que levam à degradação do glicogênio, a reserva polimérica de glicose, e à inibição da síntese adicional de glicogênio (Seção 21.3). *A PKA estimula a expressão de genes específicos* ao fosforilar um ativador da transcrição, denominado proteína de ligação do elemento de resposta ao cAMP (CREB). Essa atividade da PKA ilustra que as vias de transdução de sinais podem se estender até dentro do núcleo, alterando a expressão gênica.

A via de transdução de sinais iniciada pela epinefrina está resumida na Figura 14.9.

As proteínas G restabelecem-se espontaneamente por meio da hidrólise do GTP

O sinal iniciado pela epinefrina é desativado? *As subunidades G_α exibem atividade intrínseca de GTPase*, que é utilizada para hidrolisar o GTP ligado a GDP e P_i. Entretanto, essa reação de hidrólise é lenta, exigindo segundos a minutos. Por conseguinte, a forma da G_α com GTP é capaz de ativar componentes distais da via de transdução de sinais antes de ser desativada pela hidrólise do GTP. Em essência, *o GTP ligado atua como relógio integrante, que restabelece espontaneamente a*

subunidade G_α depois de um curto período de tempo. Após a hidrólise do GTP e a liberação de P_i, a forma da G_α ligada ao GDP associa-se novamente à Gβγ para voltar a formar a proteína heterotrimérica inativa (Figura 14.10).

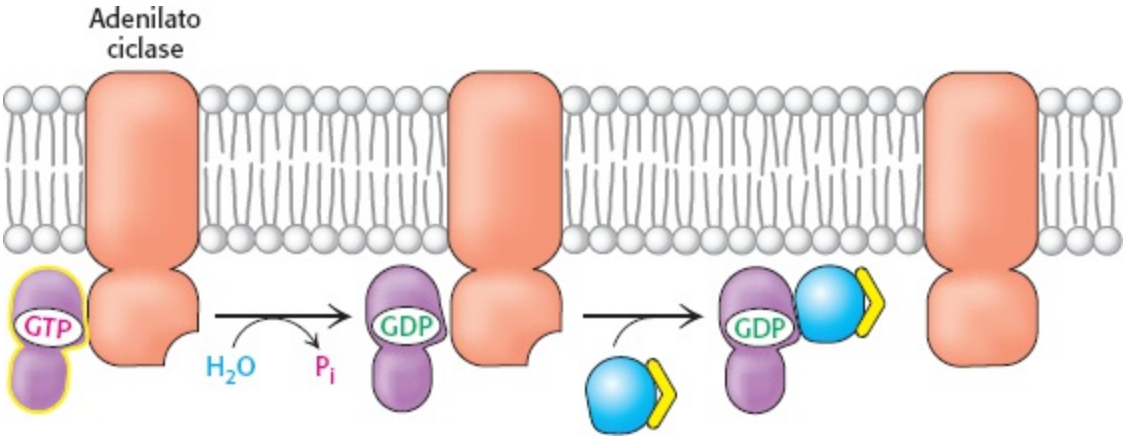


Figura 14.10 Restabelecimento da Gα. Com a hidrólise do GTP ligado pela atividade intrínseca de GTPase da G_α, esta volta a se associar com o dímero βγ para formar a proteína G heterotrimérica, terminando, assim, a ativação da adenilato ciclase.

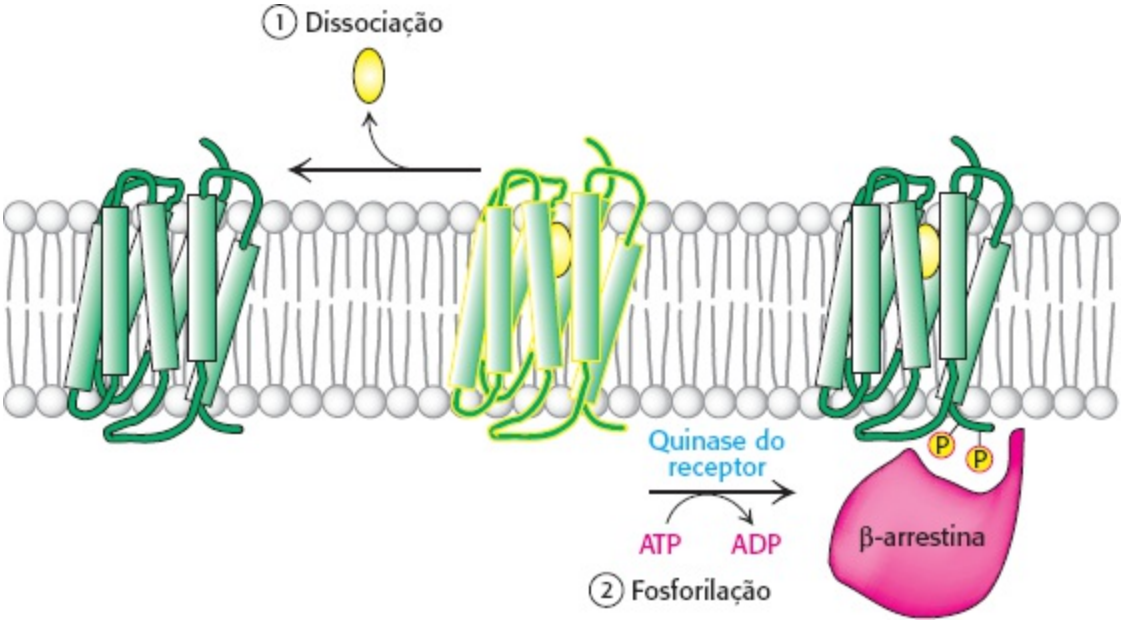


Figura 14.11 Terminação do sinal. A transdução de sinal pelo receptor 7TM é interrompida (1) pela dissociação da molécula sinalizadora do receptor e (2) pela fosforilação da cauda C-terminal citoplasmática do receptor e ligação subsequente da β-arrestina.

O receptor ativado ligado ao hormônio também precisa se restabelecer para evitar a ativação contínua das proteínas G. Esse restabelecimento é efetuado por dois processos (Figura 14.11). No primeiro, o hormônio se dissocia, de modo que o receptor retorna a seu estágio inicial não ativado. A probabilidade de que o receptor permaneça em seu estado não ligado depende da concentração extracelular do hormônio. No segundo, a cascata de sinalização iniciada pelo complexo hormônio-receptor ativa uma quinase, que fosforila os resíduos de serina e de treonina na cauda carboxiterminal do receptor. Esses eventos de fosforilação resultam na desativação do receptor. No exemplo em questão, a *quinase do receptor* beta-adrenérgico (também denominada quinase 2 do receptor de proteína G, GRK2) fosforila a cauda carboxiterminal do complexo hormônio-receptor, mas não o receptor desocupado. Por fim, a molécula de β-*arrestina* liga-se ao receptor fosforilado e

diminui ainda mais a sua capacidade de ativar proteínas G.

Alguns receptores 7TM ativam a cascata de fosfoinositídios

Examinemos agora outra cascata comum de segundo mensageiro, que também emprega um receptor 7TM, utilizada por muitos hormônios para produzir uma variedade de respostas. À semelhança da cascata do cAMP, *cascata de fosfoinositídio* converte sinais extracelulares em intracelulares. Os mensageiros intracelulares formados pela ativação dessa via surgem da clivagem do *fosfatidilinositol 4,5-bifosfato* (PIP_2), um fosfolipídio presente nas membranas celulares. Um exemplo de uma via de sinalização baseada na cascata de fosfoinositídio é uma via desencadeada pelo receptor de angiotensina II, um hormônio peptídico que controla a pressão arterial.

Cada tipo de receptor 7TM sinaliza por meio de uma proteína G distinta. Enquanto o receptor beta-adrenérgico ativa a proteína G, $G_{\alpha s}$, o receptor de angiotensina II ativa uma proteína G denominada $G_{\alpha q}$. Em sua forma com GTP, a $G_{\alpha q}$ liga-se à isoforma β da enzima *fosfolipase C* e a ativa. Essa enzima catalisa a clivagem de PIP_2 em dois segundos mensageiros: o inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol (DAG; Figura 14.12).

O IP_3 é solúvel e difunde-se para longe da membrana. Esse segundo mensageiro causa a liberação rápida de Ca^{2+} das reservas intracelulares no retículo endoplasmático (RE), que acumula um reservatório de Ca^{2+} por meio da ação de transportadores, como a Ca^{2+} ATPase (Seção 13.2). Com a ligação do IP_3, proteínas específicas dos canais de Ca^{2+} reguladas por IP_3 na membrana do RE abrem-se para possibilitar o fluxo de íons cálcio do RE para o citoplasma. O próprio íon cálcio é uma molécula sinalizadora: pode ligar-se a proteínas, incluindo uma proteína de sinalização ubíqua, denominada calmodulina, e enzimas, como a proteína quinase C. Por esses meios, o nível elevado de Ca^{2+} citoplasmático desencadeia processos como a contração do músculo liso, a degradação do glicogênio e a liberação de vesículas.

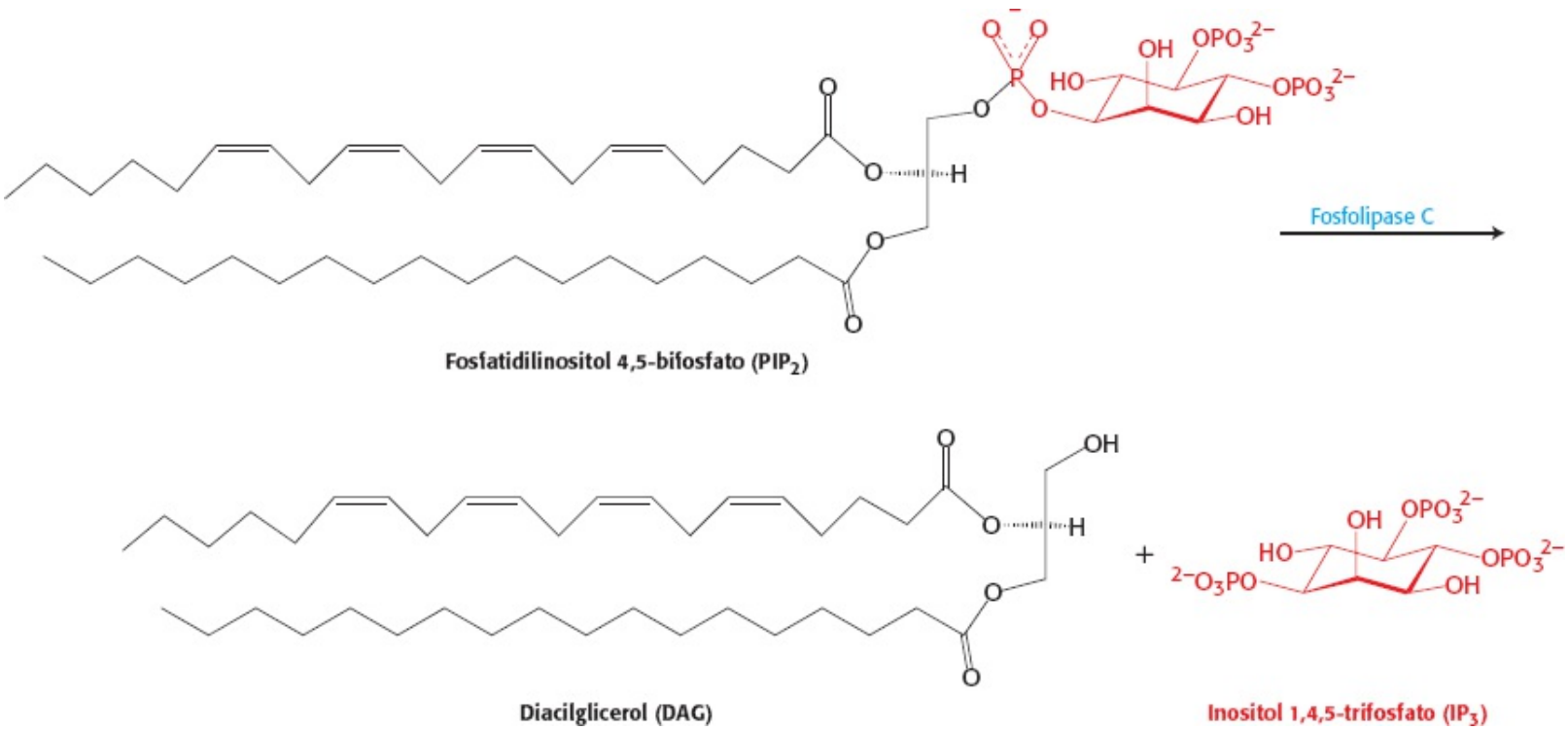


Figura 14.12 Reação da fosfolipase C. A fosfolipase C cliva o lipídio de membrana, o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, em dois segundos mensageiros: o diacilglicerol, que permanece na membrana e o inositol 1,4,5-trifosfato, que se difunde para

longe da membrana.

O DAG permanece na membrana plasmática. Nesse local, o DAG ativa a *proteína quinase C* (PKC), uma proteína quinase que fosforila resíduos de serina e de treonina em muitas proteínas-alvo. Para ligar o DAG, os domínios especializados de ligação de DAG dessa quinase necessitam de cálcio ligado*. Observe que o diacilglicerol e o IP_3 trabalham em sequência: o IP_3 aumenta a concentração de Ca^{2+}, e o Ca^{2+} facilita a ativação da proteína quinase C mediada pelo DAG. A cascata de fosfoinositídio está resumida na Figura 14.13. Tanto o IP_3 quanto o DAG atuam de modo transitório, visto que são convertidos em outras espécies por fosforilação ou outros processos.

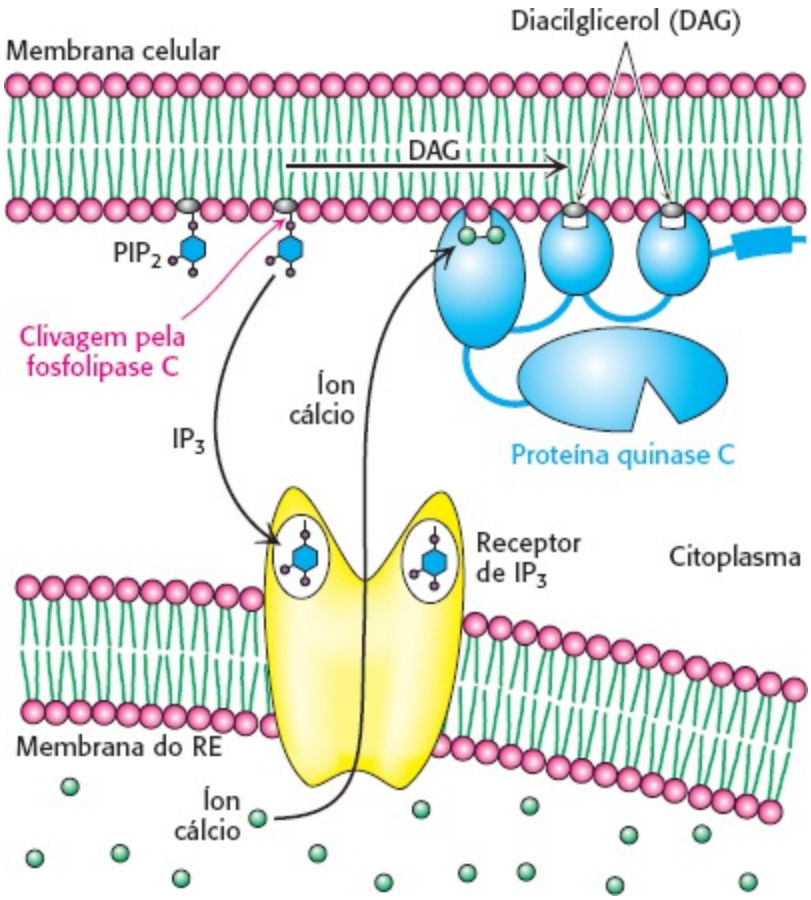


Figura 14.13 Cascata de fosfoinositídio. A clivagem de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) resulta na liberação de íons cálcio (devida à abertura dos canais iônicos do receptor de IP_3) e na ativação da proteína quinase C (devida à ligação da proteína quinase C ao DAG livre na membrana). Os íons cálcio ligam-se à proteína quinase C e ajudam a facilitar a sua ativação.

O íon cálcio é um segundo mensageiro amplamente utilizado

O íon cálcio participa em numerosos processos de sinalização, além da cascata de fosfoinositídio. Várias propriedades desse íon respondem pelo seu uso disseminado como mensageiro intracelular. Em primeiro lugar, alterações transitórias na concentração de Ca^{2+} são prontamente detectadas. No estado de equilíbrio dinâmico, os níveis intracelulares de Ca^{2+} precisam ser mantidos baixos, a fim de impedir a precipitação de compostos carboxilados e fosforilados, que formam sais pouco solúveis com o Ca^{2+}. Os níveis de íons cálcio são mantidos baixos por sistemas de transporte que expulsam o Ca^{2+} do citoplasma. Em virtude de sua ação, a concentração citoplasmática de Ca^{2+} é de aproximadamente 100 nM, ou seja, várias ordens de magnitude menor do que a concentração no meio

extracelular. Tendo em vista esse baixo nível no estado de equilíbrio dinâmico, aumentos transitórios da concentração de Ca^{2+} produzidos por eventos de sinalização podem ser rapidamente percebidos.

Uma segunda propriedade do Ca^{2+} que o torna altamente apropriado como mensageiro intracelular reside na sua capacidade de se ligar firmemente às proteínas e induzir rearranjos estruturais substanciais. Os íons cálcio ligam-se adequadamente a átomos de oxigênio de carga negativa (das cadeias laterais de glutamato e aspartato) e a átomos de oxigênio sem carga (grupos carbonílicos da cadeia principal e átomos de oxigênio de cadeias laterais da glutamina e da asparagina; Figura 14.14). A *capacidade do* Ca^{2+} *de ser coordenado a múltiplos ligantes – 6 a 8 átomos de oxigênio – possibilita a sua ligação cruzada a diferentes segmentos de uma proteína, induzindo mudanças conformacionais significativas.*

O nosso entendimento do papel do Ca^{2+} nos processos celulares tem aumentado acentuadamente graças à nossa capacidade de detectar mudanças nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} e até mesmo monitorar essas mudanças em tempo real. Essa capacidade depende da utilização de corantes especialmente desenvolvidos, como o Fura-2, que se liga ao Ca^{2+} e modifica suas propriedades fluorescentes com a ligação a este íon. O Fura-2 liga-se ao Ca^{2+} através de átomos de oxigênio adequadamente posicionados (mostrados em vermelho) dentro de sua estrutura.

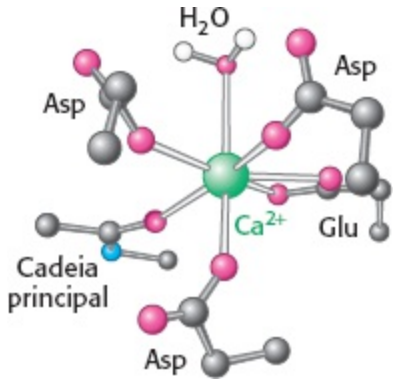
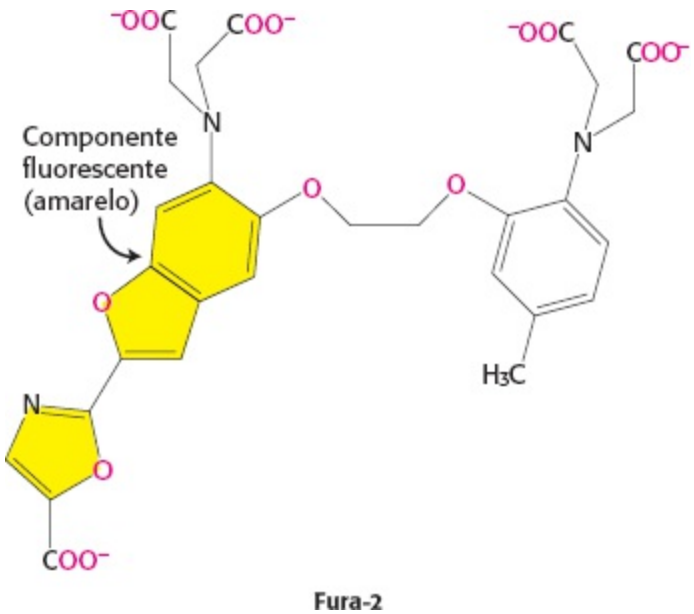


Figura 14.14 Sítio de ligação do cálcio. Em um modo comum de ligação, o cálcio é coordenado a seis átomos de oxigênio de uma proteína e um (em cima) da água.



Fura-2

Quando esse corante é introduzido nas células, é possível monitorar variações na concentração disponível de Ca^{2+} com microscópios capazes de detectar mudanças na fluorescência (Figura 14.15).

Foram também desenvolvidas sondas para reconhecer outros segundos mensageiros, como o cAMP. Esses agentes de *imagem molecular* estão cada vez mais ampliando nossa compreensão dos processos de transdução de sinais.

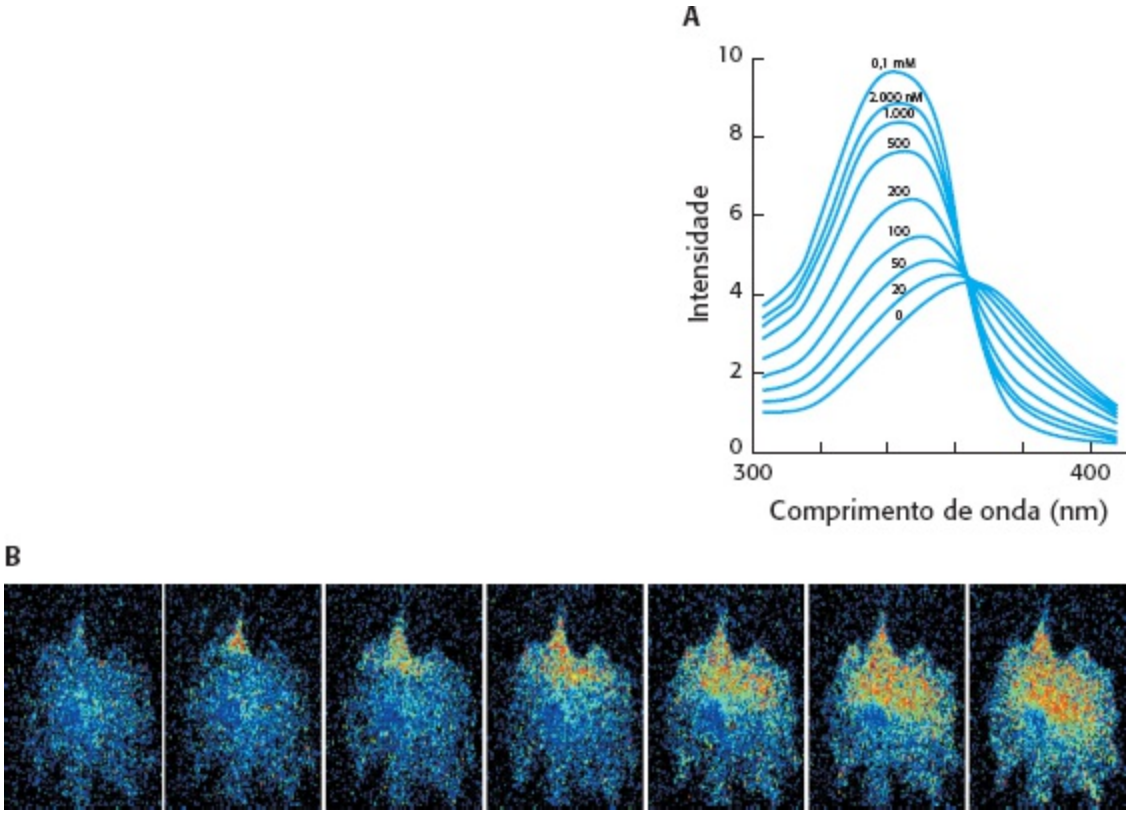


Figura 14.15 Imagens do cálcio. A. Os espectros de fluorescência do corante de ligação ao cálcio, Fura-2, podem ser utilizados para medir as concentrações disponíveis de íons cálcio em solução e nas células. **B.** Uma série de imagens mostra a disseminação do Ca^{2+} através de uma célula. Essas imagens foram obtidas pelo uso de um corante fluorescente de ligação ao cálcio. As imagens exibem uma falsa coloração: o vermelho representa altas concentrações de Ca^{2+}, e o azul, baixas concentrações de Ca^{2+}. [(A) De S. J. Lippard e J.M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry* (University Science Books, 1994), p. 193; (B) Cortesia do Dr. Masashi Isshiki, Department of Nefrology, University of Tokyo e Dr. G. W. Anderson, Department of Cell Biology, University of Texas Southwestern Medical School.]

O íon cálcio frequentemente ativa uma proteína reguladora, a calmodulina

A calmodulina (CaM), uma proteína de 17 kDa com quatro sítios de ligação para o Ca^{2+}, atua como sensor de cálcio em quase todas as células eucarióticas. *Em concentrações citoplasmáticas acima de cerca de 500 nM, o Ca^{2+} liga-se à calmodulina e a ativa.* A calmodulina é um membro da família de proteínas com mão EF (*EF hand)*. A *mão EF* é um motivo de ligação ao Ca^{2+}, constituído de uma hélice, uma alça e uma segunda hélice. Esse motivo, originalmente descoberto na proteína parvalbumina, foi denominado mão EF, visto que as duas hélices essenciais, designadas como E e F, na parvalbumina estão posicionadas como o dedo indicador e o polegar da mão direita (Figura 14.16). Essas duas hélices e a alça interveniente formam o motivo de ligação ao Ca^{2+}. Sete átomos de oxigênio estão coordenados a cada Ca^{2+}, seis da proteína e um de uma molécula de água ligada. A calmodulina é constituída de quatro motivos com mão EF, e cada um deles pode ligar-se a um único íon Ca^{2+}.

A ligação do Ca^{2+} à calmodulina induz mudanças conformacionais substanciais nas mãos EF, expondo superfícies hidrofóbicas que podem ser utilizadas para a ligação de outras proteínas. Utilizando os seus dois conjuntos de mãos EF, a calmodulina fecha-se ao redor de regiões

específicas de proteínas-alvo, expondo habitualmente as α-hélices com grupos hidrofóbicos e com carga apropriadamente posicionados (Figura 14.17). O complexo Ca^{2+} calmodulina estimula uma ampla variedade de enzimas, bombas e outras proteínas-alvo, induzindo rearranjos estruturais nesses parceiros de ligação. Um conjunto de alvos particularmente notáveis incluem várias *proteína quinases dependentes de calmodulina* (quinases CaM) que fosforilam muitas proteínas diferentes e que regulam o metabolismo energético, a permeabilidade a íons e a síntese e liberação de neurotransmissores. Vemos aqui um tema recorrente nas vias de transdução de sinais: a concentração de um segundo mensageiro (neste caso, o Ca^{2+}) é aumentada; o sinal é percebido por uma proteína de ligação de segundos mensageiros (neste caso, a calmodulina); e a proteína de ligação de segundos mensageiros atua ao produzir alterações nas enzimas (neste caso, quinases dependentes de calmodulina) que controlam efetores.

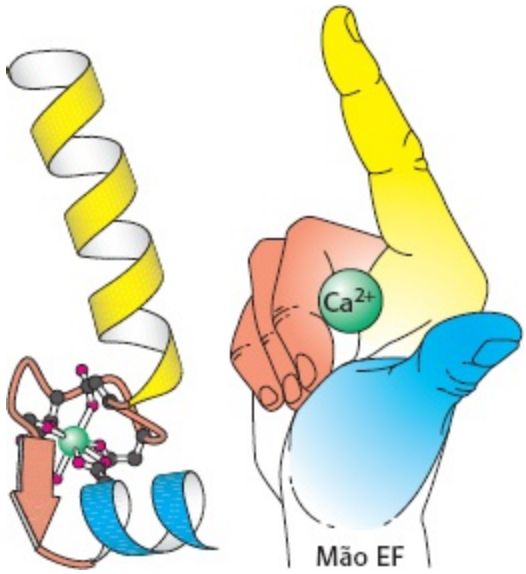


Figura 14.16 Mão EF. Formada por uma unidade hélice-alça-hélice, a mão EF constitui um sítio de ligação para o Ca^{2+} em muitas proteínas sensoras de cálcio. Aqui, a hélice E é amarela, a hélice F é azul, e o cálcio é representado pela esfera verde. *Observe* que o íon cálcio está ligado a uma alça que conecta duas hélices quase perpendiculares. [Desenhada a partir de 1CLL.pdb.]

14.2 Sinalização da insulina | As cascatas de fosforilação são fundamentais para muitos processos de transdução de sinais

As vias de sinalização que examinamos até aqui ativavam uma proteína quinase como componente distal da via. Iremos tratar agora de uma classe de vias de transdução de sinais que são *iniciadas por receptores que incluem proteína quinases como parte de suas estruturas.* A ativação dessas proteína quinases desencadeia outros processos que, em última análise, modificam os efetores dessas vias.

Um exemplo é a via de transdução de sinais iniciado pela insulina, o hormônio liberado em resposta a um aumento dos níveis de glicemia depois de uma refeição. Em todos os seus detalhes, essa via multifacetada é muito complexa. Por conseguinte, só iremos nos concentrar no ramo principal, que leva à mobilização dos transportadores de glicose para a superfície da célula. Esses transportadores capacitam a célula a captar a glicose que está presente em quantidades abundantes na corrente sanguínea depois de uma refeição.

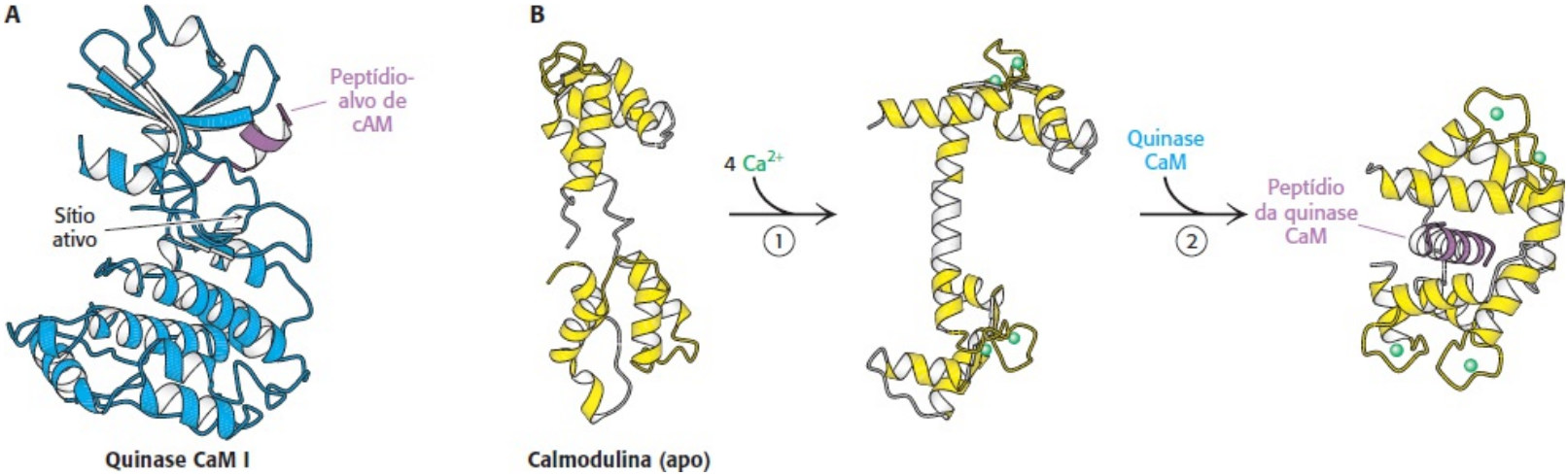


Figura 14.17 A calmodulina liga-se às α-hélices. **A.** Uma α-hélice (violeta) na quinase CaM I constitui um alvo para a calmodulina. **B.** Com a ligação do Ca^{2+} à apo ou forma da calmodulina sem cálcio (1), duas metades da calmodulina fecham-se ao redor da hélicealvo (2), ligando-a por meio de interações hidrofóbicas e iônicas. Na quinase CaM I, essa interação permite que a enzima adote uma conformação ativa. [Desenhada a partir de 1AO6, 1CFD, 1CLL e 1CM1.pdb.]

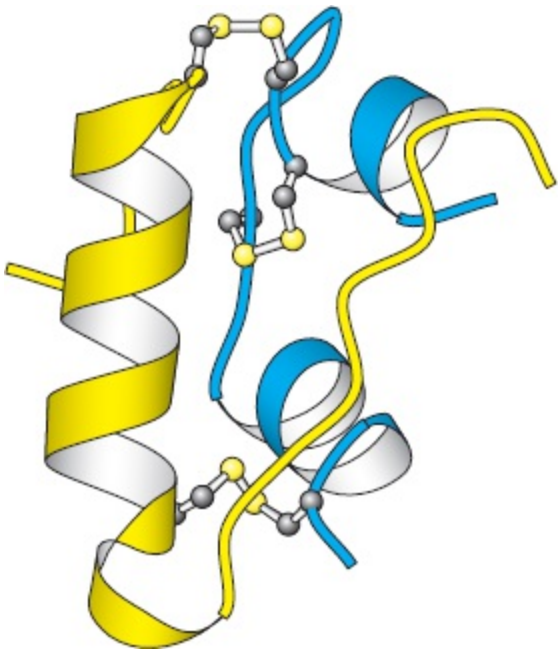


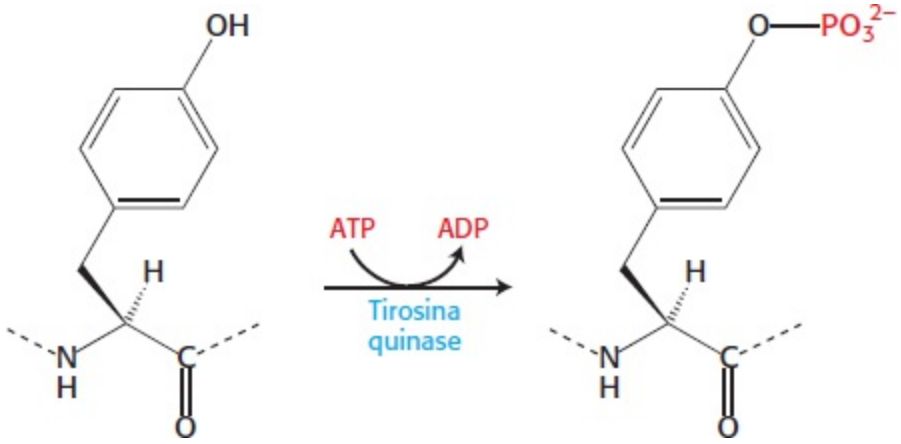
Figura 14.18 Estrutura da insulina. *Observe* que a insulina é constituída de duas cadeias (mostradas em azul e amarelo) ligadas por duas pontes de dissulfeto entre elas. A cadeia α (azul) também tem uma ponte de sulfeto intracadeia. [Desenhada a partir de 1B2F.pdb.]

O receptor de insulina é um dímero que se fecha ao redor de uma molécula de insulina ligada

A insulina é um hormônio peptídico, constituído de duas cadeias ligadas por três pontes dissulfeto (Figura 14.18). Seu receptor tem uma estrutura muito diferente daquela do β-AR. O *receptor de insulina* é um dímero constituído de duas unidades idênticas. Cada unidade consiste em uma cadeia α e uma cadeia β ligadas uma à outra por uma única ponte de dissulfeto (Figura 14.19). Cada subunidade α situa-se totalmente fora da célula, enquanto cada subunidade β encontra-se principalmente dentro da célula, atravessando a membrana com um único segmento transmembrânico. As duas subunidades α juntam-se para formar um sítio de ligação para uma única molécula de insulina, um evento surpreendente, visto que duas superfícies diferentes na molécula de insulina

precisam interagir com as duas cadeias idênticas do receptor de insulina. A aproximação das unidades diméricas na presença de uma molécula de insulina desencadeia a via de sinalização. *O fechamento de um receptor oligomérico ou a oligomerização monomérica ao redor de um ligante ligado constitui uma estratégia empregada por numerosos receptores para iniciar um sinal, particularmente por receptores que contêm uma proteina quinase.*

Cada subunidade β é constituída principalmente de um domínio de proteina quinase, homólogo à proteína quinase A. Entretanto, essa quinase difere da proteína quinase A em dois aspectos importantes. Em primeiro lugar, a quinase do receptor de insulina é uma *tirosina quinase*, isto é, ela catalisa a transferência de um grupo fosforila do ATP para um grupo hidroxila da tirosina, e não da serina ou treonina.



Como essa tirosina quinase é um componente do próprio receptor, o receptor de insulina é designado como *receptor de tirosina quinase*. Em segundo lugar, a quinase do receptor de insulina encontra-se em uma conformação inativa quando o domínio não está modificado de modo covalente. A quinase torna-se inativa pela posição de uma alça não estruturada (denominada *alça de ativação*) situada no centro da estrutura.

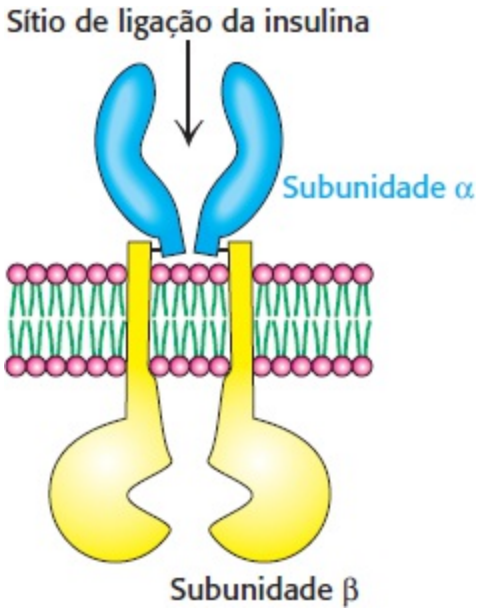


Figura 14.19 Receptor de insulina. O receptor é constituído de duas subunidades, em que cada uma delas é constituída de uma subunidade α e uma subunidade β unidas por uma ponte de dissulfeto. Duas subunidades α, que estão localizadas fora da célula, unem-se para formar um sítio de ligação para a insulina. Cada subunidade β situa-se principalmente dentro da célula e inclui um domínio de proteina quinase.

A ligação da insulina resulta em fosforilação cruzada e ativação do receptor de insulina

Quando as duas subunidades α aproximam-se para circundar uma molécula de insulina, os dois domínios de proteína quinase no interior da célula também se aproximam. É importante ressaltar que, à medida que se aproximam, a alça de ativação flexível de uma subunidade de quinase é capaz de se encaixar no sítio ativo da outra subunidade de quinase dentro do dímero. Com as duas subunidades β reunidas, os domínios de quinase catalisam a adição de grupos fosforila do ATP para resíduos de tirosina nas alças de ativação. Quando esses resíduos de tirosina são fosforilados, ocorre uma mudança conformacional notável (Figura 14.20). O rearranjo da alça de ativação converte a quinase em uma conformação ativa. Por conseguinte, *a ligação da insulina no lado externo da célula resulta em ativação de uma quinase associada à membrana dentro da célula.*

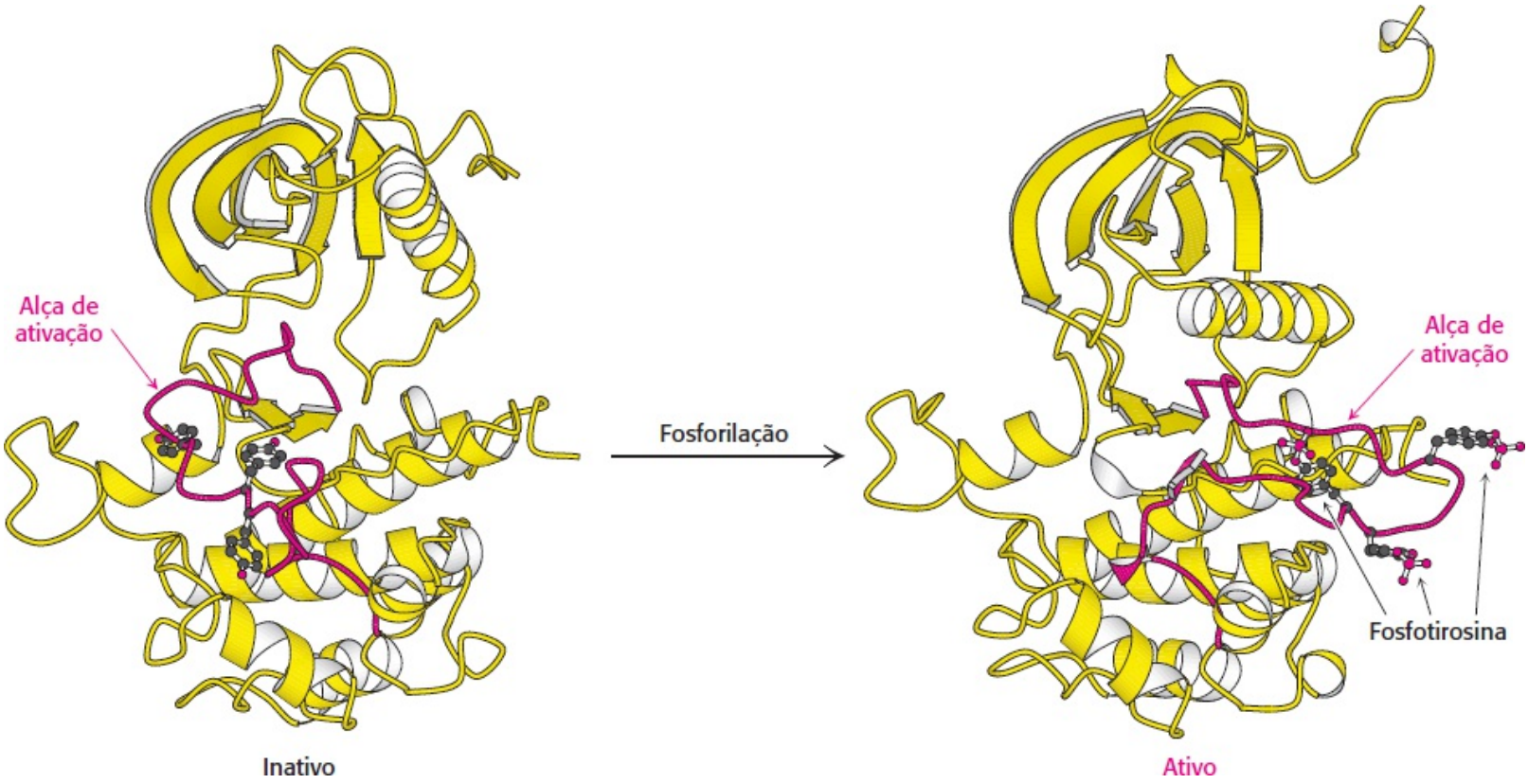


Figura 14.20 Ativação do receptor de insulina por fosforilação. A alça de ativação é mostrada em vermelho neste modelo do domínio da proteína quinase da subunidade β do receptor de insulina. A estrutura não fosforilada à esquerda não é cataliticamente ativa. *Observe* que, quando três resíduos de tirosina na alça de ativação são fosforilados, a alça de ativação desloca-se através da estrutura, e a estrutura da quinase adota uma conformação mais compacta. Essa conformação é cataliticamente ativa. [Desenhada a partir de 1IRK.pdb e 1IR3.pdb.]

A quinase ativada do receptor de insulina inicia uma cascata de quinases

Com a fosforilação, a tirosina quinase do receptor de insulina é ativada. Como as duas unidades do receptor são mantidas em estreita proximidade uma da outra, outros sítios dentro do receptor também são fosforilados. Esses sítios fosforilados atuam como sítios de ancoragem para outros substratos, incluindo uma classe de moléculas designadas como *substratos do receptor de insulina* (IRS; Figura 14.21). O IRS-1 e o IRS-2 são duas proteínas homólogas, com uma estrutura modular comum (Figura 14.22). A parte aminoterminal inclui um *domínio de homologia à plecstrina*, que se liga ao fosfoinositídio, e um domínio de ligação de fosfotirosina. Esses domínios atuam em conjunto para ancorar a proteína IRS ao receptor de insulina e à membrana associada. Cada proteína IRS contém

quatro sequências semelhantes à forma Tyr-X-X-Met. Essas sequências também são substratos para a quinase ativada do receptor de insulina. Quando os resíduos de tirosina dentro dessas sequências são fosforilados, transformando-se em resíduos de fosfotirosina, as moléculas de IRS podem atuar como *proteínas adaptadoras*: não são enzimas, mas atuam para fixar componentes distais dessa via de sinalização à membrana.

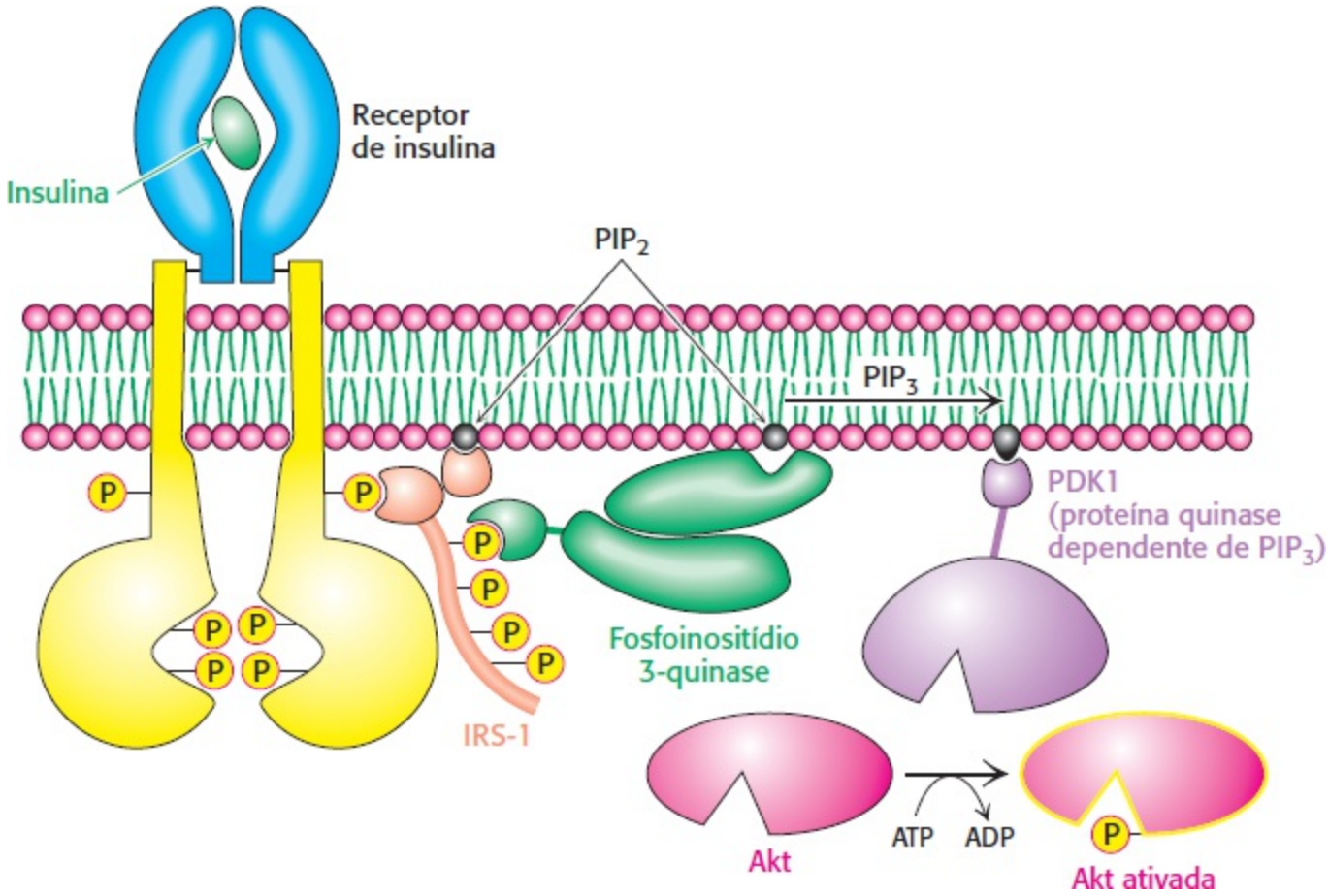


Figura 14.21 Sinalização da insulina. A ligação da insulina resulta na fosforilação cruzada e ativação do receptor de insulina. Os sítios fosforilados no receptor atuam como sítios de ligação para os substratos do receptor de insulina como o IRS-1. A lipídio quinase, a fosfoinositídio 3-quinase, liga-se aos sítios fosforilados no IRS-1 por meio de seu domínio regulatório e, em seguida, converte PIP_2 em PIP_3. A ligação ao PIP_3 ativa a proteína quinase dependente de PIP_3, que fosforila e ativa quinases, como a Akt1. A Akt1 ativada pode então difundir-se pela célula para continuar a via de transdução de sinais.

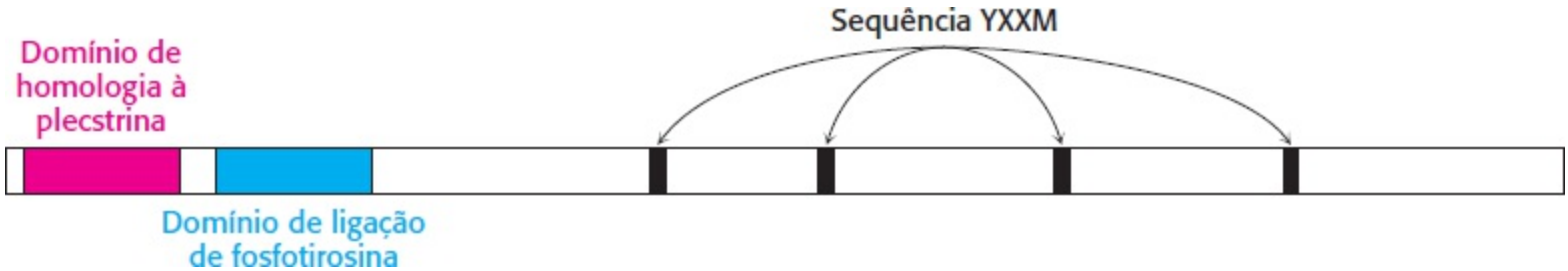


Figura 14.22 Estrutura modular dos substratos do receptor de insulina IRS-1 e IRS-2. Esta vista esquemática representa a sequência de aminoácidos comuns ao IRS-1 e ao IRS-2. Cada proteína contém um domínio de homologia de plecstrina (que se liga a lipídios fosfoinositídios), um domínio de ligação de fosfotirosina e quatro sequências que se aproximam de Tyr-X-X-Met (YXXM). Essas quatro sequências são fosforiladas pela tirosina quinase do receptor de insulina.

Os resíduos de fosfotirosina, como aqueles encontrados nas proteínas IRS, são reconhecidos mais frequentemente por domínios de *homologia Src 2* (SH2) (Figura 14.23). Esses domínios, presentes

em muitas proteínas de transdução de sinal ligam-se a segmentos do polipeptídio que contém resíduos de fosfotirosina. Cada domínio SH2 específico exibe uma preferência de ligação para a fosfotirosina em um determinado contexto de sequência. Que proteínas contêm domínios SH2 que se ligam a sequências contendo fosfotirosina nas proteínas IRS? As mais importantes delas pertencem a uma classe de lipídio quinases, denominadas fosfoinositídio 3-quinases (PI3K), que adicionam um grupo fosforila à posição 3 do inositol no fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2; Figura 12.24). Essas enzimas são heterooligômeros, constituídas de subunidades catalíticas de 110 kDa e subunidades regulatórias de 85 kDa. Por meio dos domínios SH2 nas subunidades regulatórias, essas enzimas ligam-se às proteínas IRS e são levadas até a membrana, onde podem fosforilar PIP_2, formando fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3). O PIP_3 por sua vez ativa uma proteína quinase, a PDK1 em virtude de um domínio de homologia de plecstrina presente nesta quinase, que é específico para o PIP_3. A PDK1 ativada fosforila e ativa uma outra proteína quinase. A Akt não está ancorada à membrana e move-se através da célula para fosforilar alvos que incluem componentes que controlam o tráfego do receptor de glicose GLUT4 à superfície da célula, bem como enzimas que estimulam a síntese de glicogênio (Seção 21.4).

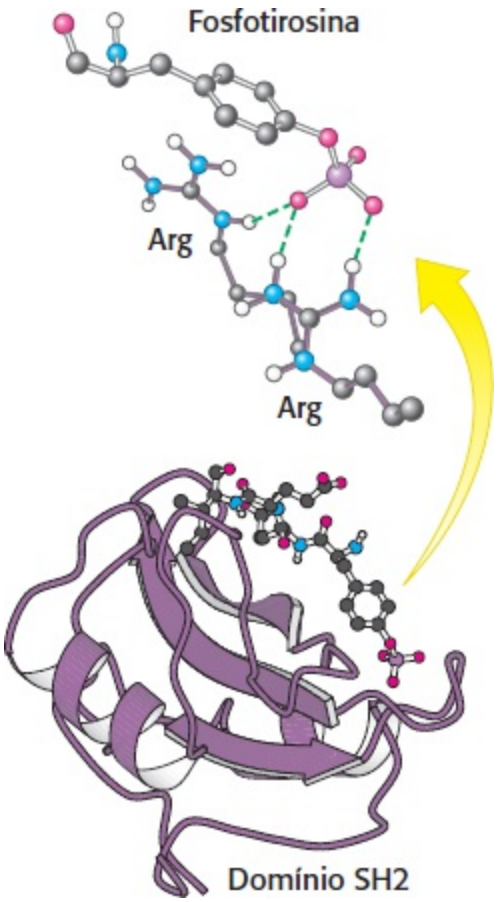


Figura 14.23 Estrutura do domínio SH_2. O domínio é mostrado ligado a um peptídio contendo fosfotirosina. *Observe* na parte superior que o resíduo de fosfotirosina de carga negativa interage com dois resíduos de arginina que são conservados em praticamente todos os domínios SH2. [Desenhada a partir de 1SPS.pdb.]

A cascata iniciada pela ligação da insulina ao receptor de insulina está resumida na Figura 14.25. O sinal é amplificado em vários estágios ao longo dessa via. Como o próprio receptor de insulina ativado é uma proteína quinase, cada receptor ativado pode fosforilar múltiplas moléculas de IRS. As enzimas ativadas amplificam ainda mais o sinal em pelo menos duas das etapas subsequentes. Por conseguinte, um pequeno aumento na concentração de insulina circulante pode produzir uma

acentuada resposta intracelular. Observe que, embora a via de sinalização da insulina descrita aqui possa parecer complicada, ela é substancialmente menos elaborada do que a rede de sinalização completa iniciada pela insulina.

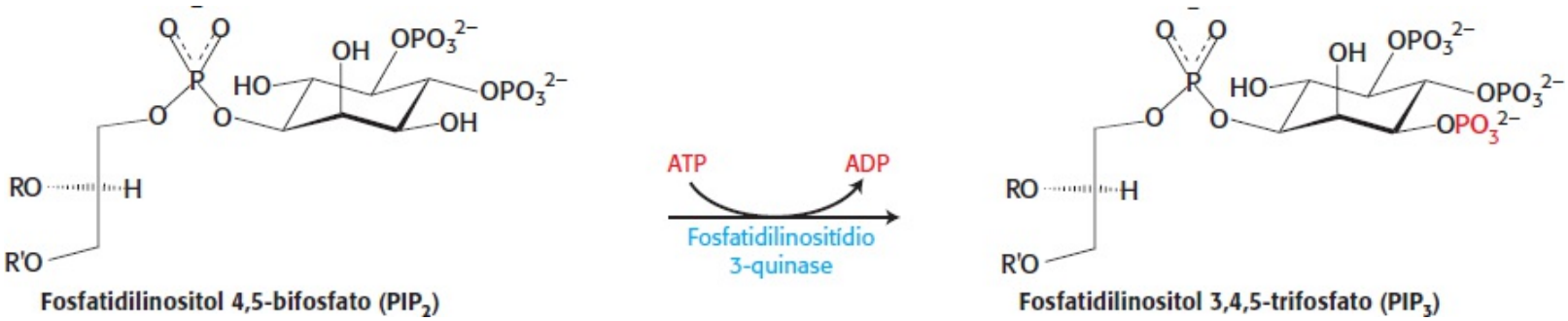


Figura 14.24 Ação de uma lipídio quinase na sinalização da insulina. O IRS-1 e o IRS-2 fosforilados ativam a enzima fosfatidilinositídio 3-quinase, uma enzima que converte PIP_2 em PIP_3.

A sinalização da insulina é terminada pela ação de fosfatases

Vimos que a proteína G ativada promove a sua própria inativação pela liberação de um grupo fosforila do GTP. Em contrapartida, proteínas fosforiladas nos resíduos de serina, treonina ou tirosina são extremamente estáveis cineticamente. São necessárias enzimas específicas, denominadas proteína fosfatases, para hidrolisar essas proteínas fosforiladas e convertê-las em seus estados iniciais. De modo semelhante, são necessárias lipídio fosfatases para remover grupos fosforila de lipídios inositóis, que foram ativados por lipídio quinases. Na sinalização da insulina, três classes de enzimas são de importância particular na interrupção da via de sinalização: as proteínas tirosina fosfatases, que removem grupos fosforila de resíduos de tirosina no receptor de insulina e das proteínas adaptadoras IRS; lipídio fosfatases, que hidrolisam o PIP_3 a PIP_2; e serina fosfatases, que removem grupos fosforila de proteína quinases ativadas, como Akt. Muitas dessas fosfatases são ativadas ou recrutadas como parte da resposta à insulina. Por conseguinte, a ligação do sinal inicial estabelece o cenário para a terminação final da resposta.

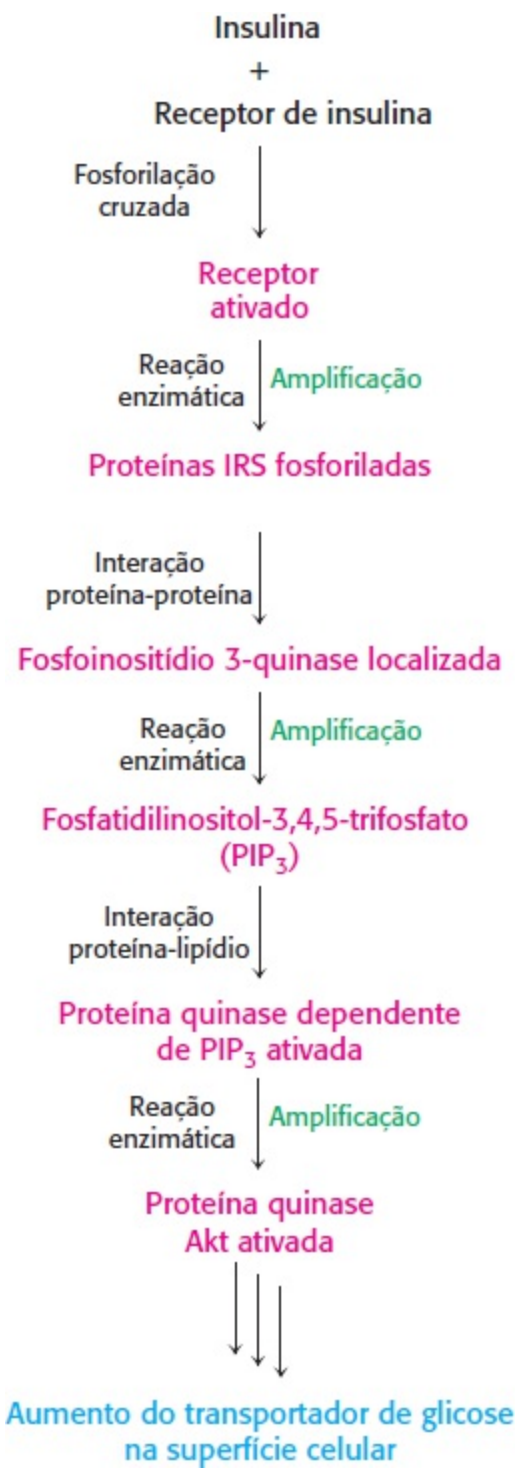


Figura 14.25 Via de sinalização da insulina. Etapas essenciais na via de transdução de sinais iniciada pela ligação da insulina ao receptor de insulina.

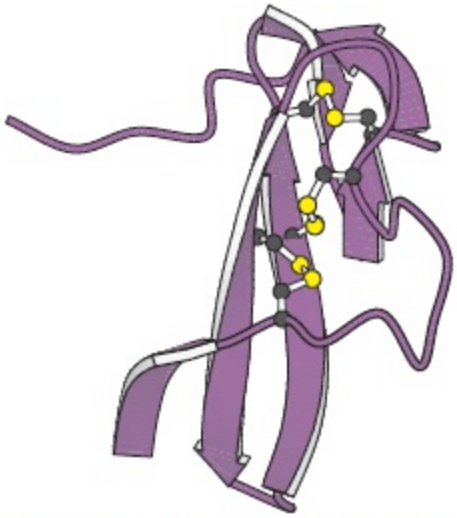


Figura 14.26 Estrutura do fator de crescimento epidérmico. *Observe* que as três pontes dissulfeto intracadeias estabilizam a estrutura tridimensional compacta do fator de crescimento. [Desenhada a partir de 1EGF.pdb.]

14.3 Sinalização do EGF | As vias de transdução de sinais são preparadas para responder

Nossa discussão das cascatas de transdução de sinais, iniciada com a epinefrina e a insulina, incluiu exemplos de como componentes das vias de transdução de sinais estão preparados para a ação, prontos para serem ativados por pequenas modificações. Por exemplo, as subunidades da proteína G necessitam apenas da ligação de GTP em troca de GDP para transmitir um sinal. Essa relação de troca é termodinamicamente favorável, porém é muito lenta na ausência de um receptor 7TM apropriado ativado. De modo semelhante, os domínios de tirosina quinase do receptor de insulina dimérico estão prontos para a fosforilação e ativação, porém necessitam da ligação da insulina entre duas subunidades α para arrastar a alça de ativação de uma tirosina quinase para dentro do sítio ativo da tirosina quinase parceira para iniciar esse processo.

Examinemos agora uma via de transdução de sinais que revela outro exemplo bem claro de como essas cascatas de sinalização estão preparadas para responder. Essa via é ativada pela molécula de sinalização, o *fator de crescimento epidérmico* (EGF). À semelhança do receptor de insulina, o iniciador dessa via é um receptor tirosina quinase. Ambos os domínios extracelular e intracelular desse receptor estão prontos para ação, mantidos sob controle apenas por uma estrutura especifica que impede a união dos receptores. Além disso, na via do EGF, encontraremos várias outras classes de componentes de sinalização que participam de muitas outras redes de sinalização.

A ligação do EGF resulta na dimerização do receptor de EGF

O fator de crescimento epidérmico é um polipeptídio de 6 kDa, que estimula o crescimento de células epidérmicas e epiteliais (Figura 14.26). O *receptor de EGF* (EGFR), como o da insulina, é um dímero de duas subunidades idênticas. Cada subunidade contém um domínio de proteína tirosina quinase intracelular, que participa de reações de fosforilação cruzada (Figura 14.27). Entretanto, diferentemente daquelas do receptor de insulina, essas unidades existem como monômeros até que ocorra a sua ligação ao EGF. Além disso, cada monômero do receptor de EGF liga-se a uma única

molécula de EGF em seu domínio extracelular (Figura 14.28). Por conseguinte, o dímero ligase a duas moléculas de ligante diferentemente do dímero do receptor de insulina, que se liga apenas a um ligante. Observe que cada molécula de EGF situa-se a uma distância da interface do dímero. Essa interface inclui um denominado *braço de dimerização* de cada monômero, que se estende para fora e se insere em uma bolsa de ligação no outro monômero.

Figura 14.27 Estrutura modular do receptor de EGF. Essa vista esquemática da sequência de aminoácidos do receptor de EGF mostra o domínio de ligação de EGF situado fora da célula, uma única região formadora de hélice transmembrânica, o domínio intracelular de tirosina quinase e o domínio rico em tirosinas da extremidade carboxiterminal.

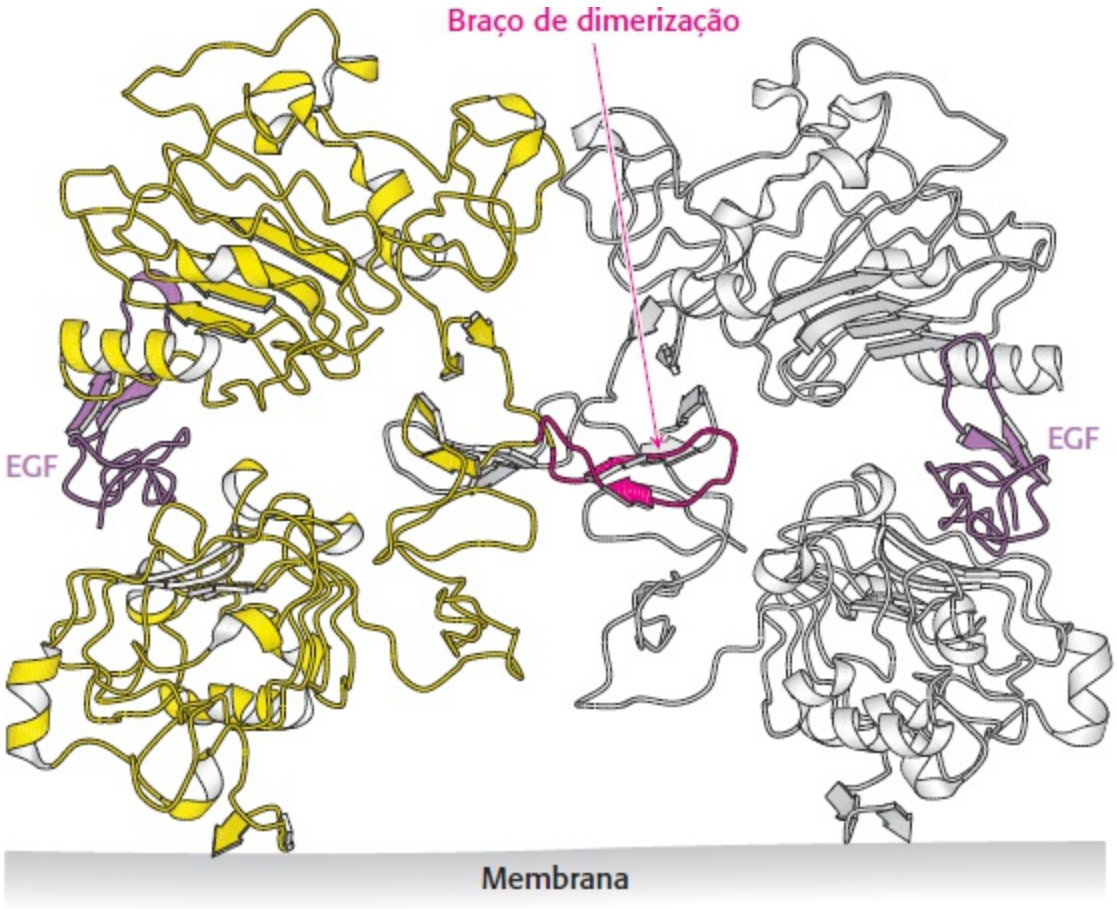


Figura 14.28 Dimerização do receptor de EGF. A estrutura da região extracelular do receptor do EGF é mostrada ligada ao EGF. *Observe* que a estrutura é dimérica, com uma molécula de EGF ligada a cada molécula de receptor, e que a dimerização é mediada por um braço de dimerização que se estende a partir de cada molécula de receptor. [Desenhada a partir de 1IVO.pdb.]

Embora essa estrutura revele muito bem as interações que sustentam a formação de um dímero de receptor, favorecendo a fosforilação cruzada, surge outra questão: por que o receptor não sofre dimerização e não sinaliza na ausência do EGF? Essa questão foi abordada quanto da análise da estrutura do receptor de EGF na ausência do ligante (Figura 14.29). Com efeito, essa estrutura é monomérica, e cada monômero encontra-se em uma conformação que é muito diferente daquela observada no dímero ligado ao ligante. Em particular, o braço de dimerização liga-se a um domínio *dentro do mesmo monômero* que mantém o receptor em uma configuração fechada. Em essência, o

receptor está preparado em uma conformação acionada por uma mola, mantida em posição pelo contato entre a alça de interação e outra parte da estrutura, pronta para ligar-se ao ligante e mudar para uma conformação ativa para dimerização e sinalização.

Essa observação sugere que um receptor que exista na conformação distendida, mesmo na ausência do ligante, seria constitutivamente ativo. É notável que esse receptor exista. Esse receptor, o Her2, tem uma sequência de aminoácidos aproximadamente 50% idêntica à do receptor de EGF e tem a mesma estrutura de domínios. O Her2 não se liga a nenhum ligante conhecido; contudo, os estudos de cristalografia revelaram que ele adota uma estrutura distendida muito semelhante àquela observada do receptor de EGF ligado ao ligante. Em condições normais, o Her2 forma heterodímeros com o receptor de EGF e outros membros da família do dos receptores EGF e também participa em reações de fosforilação cruzada com esses receptores. O Her2 é hiperexpresso em alguns tipos de câncer, contribuindo, presumivelmente, para o crescimento do tumor por meio da formação de homodímeros que sinalizam mesmo na ausência do ligante. Retornaremos ao Her2 quando considerarmos as abordagens para o tratamento do câncer baseadas no conhecimento das vias de sinalização (Seção 14.5).

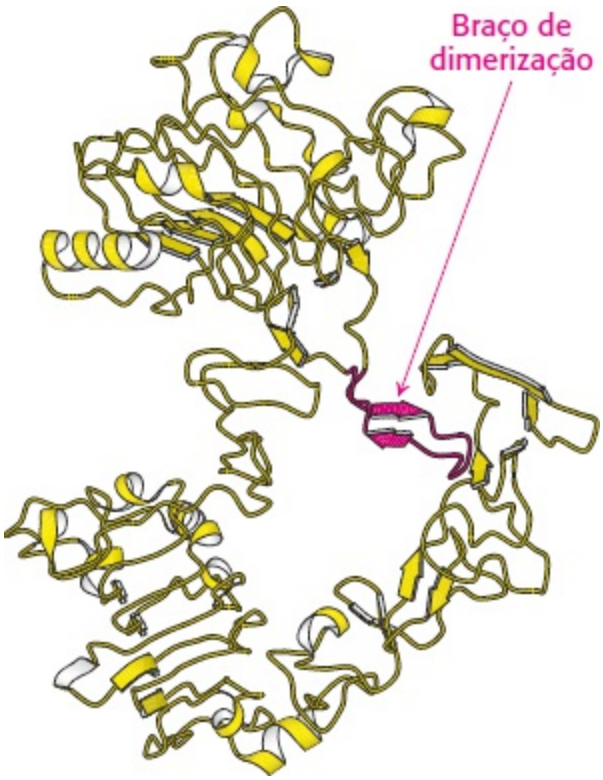


Figura 14.29 Estrutura do receptor de EGF não ativado. O domínio extracelular do receptor de EDGF é mostrado na ausência de EGF ligado. *Observe* que o braço de dimerização está ligado a uma parte do receptor que o torna indisponível para a interação com outro receptor. [Desenhada a partir de 1NQL.pdb.]

O receptor de EGF sofre fosforilação de sua cauda carboxiterminal

À semelhança do receptor de insulina, o receptor de EGF sofre fosforilação cruzada de uma unidade pela outra dentro de um dímero. Todavia, diferentemente do receptor de insulina, o sítio dessa fosforilação não se encontra dentro da alça de ativação da quinase, porém em uma região situada no lado C-terminal do domínio quinase. Até cinco resíduos de tirosina são fosforilados nessa região. A dimerização do receptor de EGF traz a região C-terminal de um receptor para o sítio ativo de sua

quinase parceira. A própria quinase encontra-se em uma conformação ativa sem fosforilação, revelando mais uma vez como esse sistema de sinalização está preparado para responder.

A sinalização do EGF leva à ativação de Ras, uma proteína G pequena

As fosfotirosinas nos receptores de EGF atuam como sítios de ancoragem para os domínios SH2 em outras proteínas. A cascata de sinalização intracelular começa com a ligação de *Grb-2*, uma proteína adaptadora essencial que contém o domínio SH2 e dois domínios de *homologia 3 Src* (SH3). Com a fosforilação do receptor, o domínio SH3 da Grb-2 liga-se aos resíduos de fosfotirosina do receptor tirosina quinase. Por meio de seus dois domínios SH3, a Grb-2 então se liga a polipeptídios ricos em poliprolina dentro de uma proteína denominada *Sos*. Por sua vez, a Sos liga-se à Ras e a ativa. A Ras, um componente muito proeminente da transdução de sinais, é um membro de uma classe de proteínas denominadas *proteínas G pequenas*. À semelhança das proteínas G descritas na Seção 14.1, a s proteínas G pequenas contêm GDP ligado em suas formas não ativadas. A Sos abre a bolsa de ligação de nucleotídio da Ras, possibilitando o escape de GDP e a entrada de GTP em seu lugar. Devido a seu efeito sobre a Ras, a Sos é designada como *fator de troca de nucleotídios de guanina* (GEF). Por conseguinte, a ligação do EGF a seu receptor leva à conversão da Ras em sua forma com GTP através da intermediação de Grb-2 e Sos (Figura 14.30).

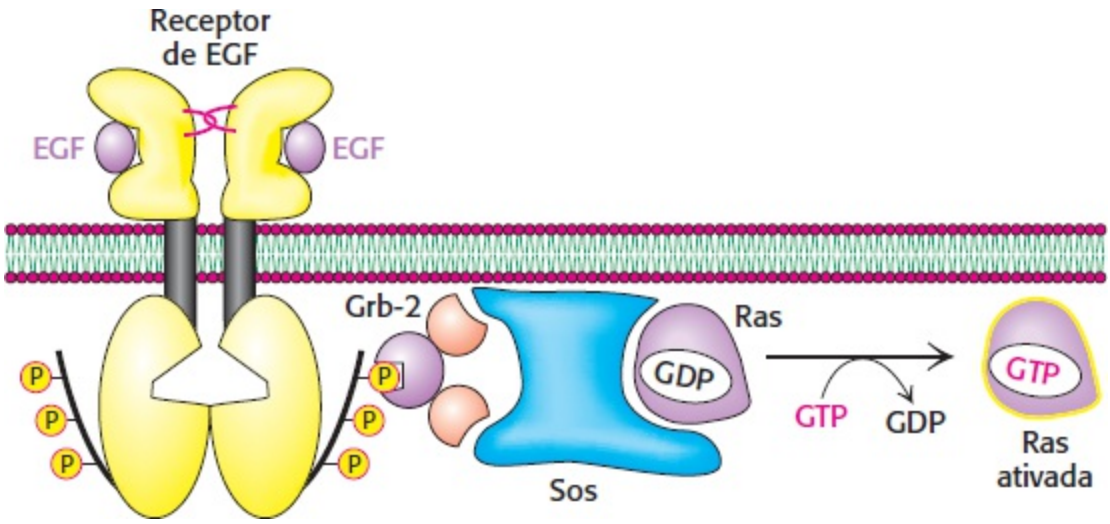


Figura 14.30 Mecanismo de ativação de Ras. A dimerização do receptor de EGF devido à ligação de EGF leva à fosforilação das caudas C-terminais do receptor, ao recrutamento subsequente de Grb-2 e Sos e à troca de GDP por GTP na Ras. Essa via de transdução resulta na conversão de Ras em sua forma ativada ligada ao GTP.

A Ras ativada inicia uma cascata de proteína quinases

A Ras modifica a sua conformação quando é transformada de sua forma com GDP em sua forma GTP. Na forma com GTP, a Ras liga-se a outras proteínas, incluindo uma proteína quinase denominada *Raf*. Quando ligada à Ras, a Raf sofre uma mudança conformacional, que ativa o domínio de proteína quinase da Raf. Tanto a Ras quanto a Raf estão ancoradas à membrana por meio de lipídios isoprênicos ligados covalentemente. Em seguida, a Raf ativada fosforila outras proteínas, incluindo proteína quinases denominadas MEK. Por sua vez, as MEK ativam quinases denominadas *quinases reguladas por sinais extracelulares* (ERK *do inglês extracellular signal-regulated kinases*). Em seguida, as ERK fosforilam numerosos substratos, incluindo fatores de transcrição no núcleo, bem

como outras proteína quinases. O fluxo completo de informações desde a chegada do EGF na superfície celular até alterações na expressão gênica está resumido na Figura 14.31.

Figura 14.31 Via de sinalização do EGF. Etapas essenciais na via iniciada pela ligação do EGF a seu receptor. Uma cascata de quinases leva à fosforilação de fatores de transcrição e a alterações concomitantes na expressão gênica.

As proteínas G pequenas ou GTPases pequenas constituem uma grande superfamília de proteínas – agrupadas em subfamílias denominadas Ras, Rho, Arf, Rab e Ran –, que desempenham um importante papel em uma variedade de funções celulares, incluindo crescimento, diferenciação, motilidade celular, citocinese e transporte de materiais através da célula (Tabela 14.2). À semelhança das proteínas G heterotriméricas, as proteínas G pequenas alternam-se entre uma forma ativa ligada ao GTP e uma forma inativa ligada ao GDP. Diferem das proteínas G heterotriméricas por serem menores (20 a 25 kDa *versus* 30 a 35 kDa) e monoméricas. Todavia, as duas famílias estão relacionadas por evolução divergente, e as proteínas G pequenas têm numerosos motivos-chave mecanísticos e estruturais em comum com a subunidade G_{α} das proteínas G

heterotriméricas.

O sinal do EGF é concluído por proteína fosfatases e pela atividade intrínseca de GTPase da Ras

Devido ao grande número de componentes da via de transdução de sinais do EGF que são ativados por fosforilação, podemos esperar que as proteína fosfatases desempenhem papeis fundamentais na terminação da sinalização do EGF. De fato, fosfatases cruciais removem grupos fosforila de resíduos de tirosina no receptor de EGF e de resíduos de serina, treonina e tirosina das proteína quinases que participam na cascata de sinalização. O próprio processo de sinalização desencadeia os eventos que ativam muitas dessas fosfatases. Em consequência, a ativação do sinal também inicia o seu término.

À semelhança das proteínas G ativadas por receptores 7TM, a Ras possui atividade intrínseca de GTPase. Por conseguinte, a forma ativada de Ras com GTP sofre conversão espontânea na forma inativa com GDP. A velocidade de conversão pode ser acelerada na presença de proteínas ativadoras de GTPase (GAP, *do inglês GTPase-activating proteins*), proteínas que interagem com proteínas G pequenas na forma com GTP e que facilitam a hidrólise do GTP. Por conseguinte, o tempo de vida da Ras ativada é regulado por proteínas acessórias na célula. A atividade de GTPase da Ras é crucial para o término de sinais que levam ao crescimento celular, de modo que não é surpreendente que sejam encontradas mutações de Ras em muitos tipos de câncer, conforme discutido na Seção 14.5.

Tabela 14.2 Superfamília Ras de GTPases.

Subfamília	Função
Ras	Regula o crescimento celular por meio de serina-treonina proteína quinases
Rho	Reorganiza o citoesqueleto por meio de serina-treonina proteína quinases
Arf	Ativa a ADP-ribosiltransferase da subunidade A da toxina do cólera; regula as vias de tráfego de vesículas; ativa a fosfolipase D
Rab	Desempenha um papel essencial em vias secretoras e de endocitose
Ran	Funciona no transporte de RNA e proteínas para dentro e para fora do núcleo

14.4 Muitos elementos reaparecem com variações em diferentes vias de transdução de sinais

Podemos começar a perceber a complexidade das vias de transdução de sinais ao anotarmos os diversos temas comuns que apareceram consistentemente nas vias descritas neste capítulo e que estão na base de muitas vias de sinalização adicionais que não são consideradas aqui.

1. *As proteína quinases são fundamentais para muitas vias de transdução de sinais*. As proteína quinases são essenciais para todas as três vias de transdução de sinais descritas neste capítulo. Na via iniciada pela epinefrina, a proteína quinase dependente de cAMP (PKA) situa-se no final da via,

transduzindo informações representadas por uma elevação da concentração de cAMP em modificações covalentes que alteram a atividade de enzimas metabólicas importantes. Nas vias iniciadas pela insulina e pelo EGF, os próprios receptores são proteína quinases, e várias proteína quinases adicionais participam distalmente nas vias. A amplificação do sinal devida às cascatas de proteína quinases constitui uma característica comum a todas as três vias. Embora não sejam apresentadas neste capítulo, as proteína quinases frequentemente fosforilam múltiplos substratos e, portanto, são capazes de gerar uma diversidade de respostas.

2. *Os segundos mensageiros participam de muitas vias de transdução de sinais.* Encontramos vários segundos mensageiros, incluindo cAMP, Ca^{2+}, IP_3 e o lipídio DAG. Como os segundos mensageiros são ativados por enzimas ou pela abertura de canais iônicos, suas concentrações podem ser enormemente amplificadas, em comparação com os sinais que levam à sua geração. Existem proteínas especializadas que percebem as concentrações desses segundos mensageiros e que continuam o fluxo de informação ao longo das vias de transdução de sinais.

Os segundos mensageiros que analisamos reaparecem em muitas outras vias de transdução de sinais. Por exemplo, em uma consideração dos sistemas sensoriais, no Capítulo 33, veremos como a sinalização baseada no Ca^{2+} e a sinalização baseada em nucleotídios cíclicos desempenham papeis fundamentais na visão e na olfação.

3. *Domínios especializados que medeiam interações específicas estão presentes em muitas proteínas sinalizadoras.* O estabelecimento de uma "rede" em muitas vias de transdução de sinais baseia-se em domínios particulares de proteínas, que medeiam as interações entre componentes proteicos de determinada cascata de sinalização. Já encontramos vários deles, incluindo domínios de homologia de plecstrina, que facilitam as interações de proteínas com o lipídio PIP_3; os domínios SH2, que medeiam as interações dos polipeptídios contendo resíduos de tirosina fosforilados; e domínios SH3, que interagem com sequências peptídicas que contêm muitos resíduos de prolina. Existem muitas outras famílias de domínios desse tipo. Em muitos casos, membros individuais de cada família de domínios exibem características singulares que possibilitam a sua ligação a seus alvos apenas dentro de determinado contexto de sequência, tornando-os específicos para determinada via de sinalização e impedindo a comunicação cruzada indesejável. *As vias de transdução de sinais evoluíram, em grande parte, pela incorporação de fragmentos de DNA que codificam esses domínios em genes que codificam componentes da via.*

A presença desses domínios é de grande utilidade para que os cientistas possam desvendar as vias de transdução de sinais. Quando uma proteína em uma via de transdução de sinas é identificada, sua sequência de aminoácidos pode ser analisada quanto à presença desses domínios especializados pelos métodos descritos no Capítulo 6. Se forem encontrados um ou mais domínios de função conhecida, é frequentemente possível desenvolver hipóteses claras acerca dos parceiros potenciais de ligação e dos mecanismos de transdução de sinais.

14.5 Defeitos nas vias de transdução de sinais podem levar ao câncer e a outras doenças

Tendo em vista a sua complexidade, não é surpreendente que, em certas ocasiões, as vias de

transdução de sinais falhem, resultando em estados patológicos ou em doenças. O câncer – um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado ou inadequado de células – está fortemente associado a defeitos nas proteínas de transdução de sinais. Com efeito, o estudo do câncer, particularmente dos tipos de câncer causados por determinados vírus, tem contribuído enormemente para o nosso entendimento das proteínas e das vias de transdução de sinais.

Por exemplo, o vírus do sarcoma de Rous é um retrovírus que causa sarcoma (um câncer de tecidos de origem mesodérmica, como o músculo ou o tecido conjuntivo) em galinhas. Além dos genes necessários para a sua replicação, este vírus apresenta um gene denominado v-*src*. O gene v-*src* é um *oncogene*, que leva à produção de características semelhantes ao câncer em tipos celulares suscetíveis. A proteína codificada pelo gene v-*src*, a v-Src, é uma proteína tirosina quinase, que inclui os domínios SH2 e SH3. A proteína v-Src assemelha-se, na sua sequência de aminoácidos, a uma proteína normalmente encontrada nas células musculares de galinhas, designada como c-Src (de Src celular; Figura 14.32A). O gene c-*src* não induz transformação celular e é denominado *proto-oncogene*, para se referir ao fato de que esse gene, quando mutado, pode ser convertido em um oncogene. A proteína que ele codifica é uma proteína de transdução de sinais, que regula o crescimento celular.

Por que a atividade biológica da proteína v-Src é tão diferente daquela da c-Src? A c-Src contém um resíduo de tirosina essencial próximo à sua extremidade C-terminal, que, quando fosforilado, faz uma ligação intramolecular com o domínio SH2 proximal (Figura 14.32B). Essa interação mantém o domínio de quinase em uma conformação inativa. Todavia, na v-Src, os 19 aminoácidos C-terminais da c-Src são substituídos por um segmento totalmente diferente de 11 aminoácidos, que carece desse resíduo crítico de tirosina. Por conseguinte, a v-Src é sempre ativa e pode promover o crescimento desregulado das células. Desde a descoberta do Src, muitas outras proteína quinases mutantes foram identificadas como oncogenes.

O gene que codifica Ras, um componente da via iniciada pelo EGF, é um dos genes mais comumente mutados nos tumores humanos. As células de mamíferos contêm três proteínas Ras de 21 kDa (Ras H, K e N), e cada uma delas alterna-se entre as formas inativa com GDP e ativa com GTP. As mutações mais comuns nos tumores levam a uma perda da capacidade de hidrolisar o GTP. Por conseguinte, a proteína Ras fica retida na posição ativada e continua estimulando o crescimento celular, mesmo na ausência de um sinal continuado.

Outros genes só podem contribuir para o desenvolvimento de câncer quando ambas as cópias do gene normalmente presente em uma célula são deletados ou de outro modo danificados. Esses genes são denominados *genes supressores tumorais*. Por exemplo, os genes para algumas das fosfatases que participam na terminação da sinalização do EGF são supressores tumorais. Na ausência de qualquer fosfatase funcional, a sinalização do EGF persiste uma vez iniciada, estimulando o crescimento celular inapropriado.

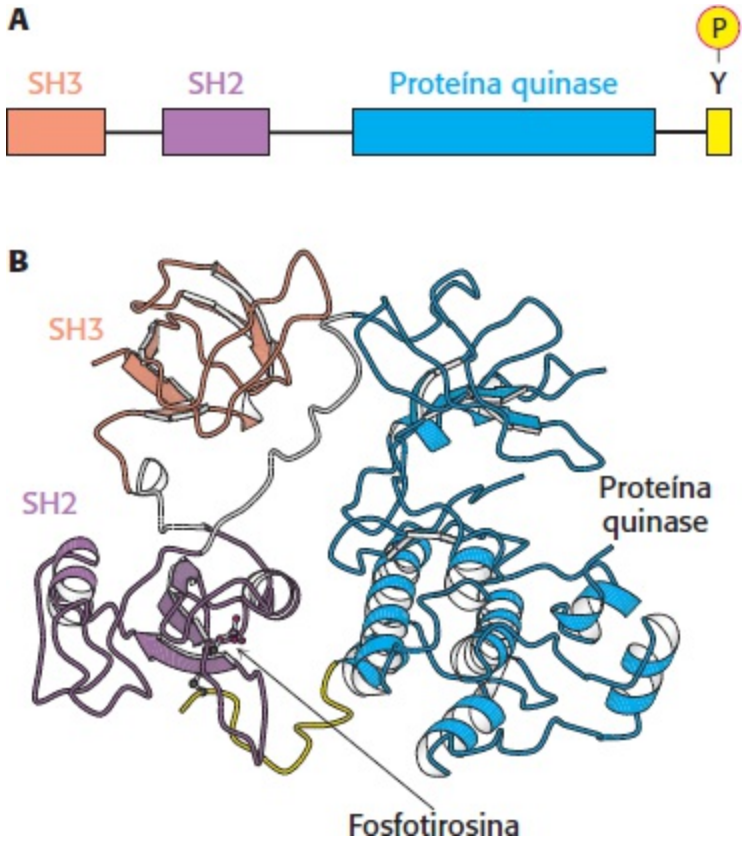


Figura 14.32 Estrutura da Src. A. A Src celular inclui um domínio SH3, um domínio SH2, um domínio de proteína quinase e uma cauda carboxiterminal que inclui um resíduo essencial de tirosina. **B.** Estrutura da c-Src em uma forma inativada, com o resíduo essencial de tirosina, fosforilado. *Observe* como os três domínios atuam em conjunto para manter a enzima em uma conformação inativa: o resíduo de fosfotirosina está ligado ao domínio SH2, e a união entre o domínio SH2 e o domínio de proteína quinase é ligada pelo domínio SH3. [Desenhada a partir de 2PTK.pdb.]

Anticorpos monoclonais Podem ser utilizados para inibir as vias de transdução de sinais ativadas em tumores

Com frequência, são observados receptores acoplados a tirosina quinases mutantes ou hiperexpressos nos tumores. Por exemplo, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é hiperexpresso em alguns tipos de cânceres epiteliais humanos, incluindo câncer de mama, de ovário e colorretal. Como uma determinada quantidade pequena do receptor pode sofrer dimerização e ativar a via de sinalização, mesmo sem ligação ao EGF, a hiperexpressão do receptor aumenta a probabilidade de que um sinal de "crescimento e divisão" seja inapropriadamente enviado à célula. Esse entendimento das vias de transdução de sinais relacionadas com o câncer levou a uma abordagem terapêutica que tem como alvo o EGFR. A estratégia consiste em produzir anticorpos monoclonais contra os domínios extracelulares dos receptores agressores. Um desses anticorpos, o cetuximabe, tem sido dirigido efetivamente contra o EGFR nos cânceres colorretais. O cetuximabe inibe o EGFR ao competir com o EGF pelo sítio de ligação no receptor. Como o anticorpo bloqueia estericamente a mudança de conformação que expõe o braço de dimerização, o próprio anticorpo não pode induzir dimerização. O resultado é que a via controlada pelo EGFR não é iniciada.

O cetuximabe não é o único anticorpo monoclonal que foi desenvolvido para ser direcionado contra um receptor tirosina quinase. O trastuzumabe inibe outro membro da família do EGFR, Her2, que é hiperexpresso em cerca de 30% dos cânceres de mama. Convém lembrar que essa proteína pode sinalizar até mesmo na ausência de ligante, por conseguinte, é particularmente provável que a

hiperexpressão estimule a proliferação celular. Hoje em dia, as pacientes com câncer de mama estão sendo submetidas a triagem para hiperexpressão de Her2 e tratadas com Herceptin, quando apropriado. Por conseguinte, o tratamento desse câncer é individualizado para as características genéticas do tumor.

Inibidores da proteína quinase podem ser efetivos como agentes antineoplásicos

A ocorrência disseminada de proteína quinases hiperativas em células cancerosas sugere que moléculas capazes de inibir essas enzimas poderiam atuar como agentes antitumorais. Por exemplo, mais de 90% dos pacientes com leucemia mielógena crônica (LMC) apresentam um defeito cromossômico específico nas células cancerosas (Figura 14.33). A translocação do material genético entre os cromossomos 9 e 22 leva à inserção do gene c-*abl*, que codifica uma tirosina quinase da família Src, no gene *bcr* do cromossomo 22. O resultado é a produção de uma proteína de fusão, denominada Bcr-Abl que consiste primariamente em sequências da c-Abl quinase. Entretanto, o gene *bcr-abl* não é regulado de modo adequado; com efeito, é expresso em níveis mais altos do que o gene que codifica a c-Abl normal, estimulando uma via promotora de crescimento. Em virtude dessa hiperexpressão, as células leucêmicas expressam um alvo singular para quimioterapia. Um inibidor específico da Bcr-Abl quinase, Gleevec (STI-571, mesilato de imatinibe), demonstrou ser um tratamento altamente efetivo para pacientes que sofrem de LMC. Essa abordagem da quimioterapia do câncer é fundamentalmente distinta da maioria das abordagens, que são direcionadas contra todas as células de crescimento rápido, incluindo células normais. *Por conseguinte, a compreensão das vias de transdução de sinais está proporcionando tratamentos conceitualmente novos para a doença.*

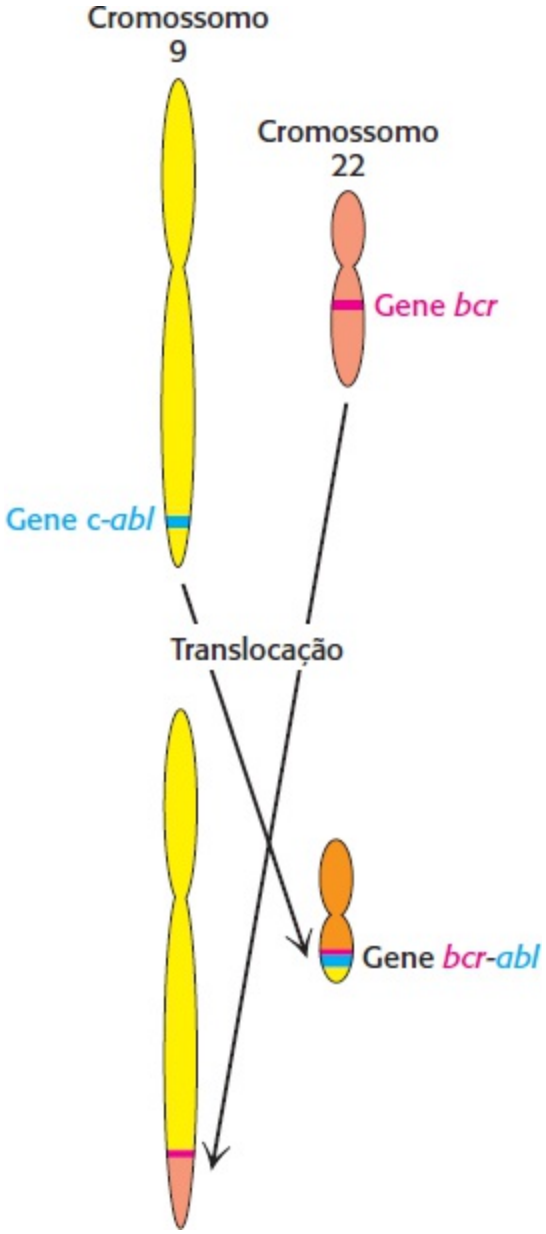


Figura 14.33 Formação do gene *bcr-abl* por translocação. Na leucemia mielógena crônica, partes dos cromossomos 9 e 22 sofrem troca recíproca, com consequente fusão dos genes *bcr* e *abl*. A proteína quinase codificada pelo gene *bcr-abl* é expressa em níveis mais elevados nas células que apresentam essa translocação do que o gene c-*abl* nas células normais.

O cólera e a coqueluche resultam da atividade alterada da proteína G

Embora defeitos das vias de transdução de sinais tenham sido mais extensamente estudados no contexto do câncer, esses defeitos também são importantes em muitas outras doenças. O cólera e a coqueluche são duas patologias das vias de sinalização dependentes de proteína G. Consideremos inicialmente o mecanismo de ação da toxina do cólera, que é secretada pela bactéria intestinal, *Vibrio cholerae*. O cólera é uma doença diarreica aguda potencialmente fatal, transmitida por água e alimentos contaminados. Causa secreção volumosa de eletrólitos e líquidos do intestino dos indivíduos infectados. A toxina do cólera, o *colerágeno*, é uma proteína composta de duas unidades funcionais – uma subunidade β que se liga aos gangliosídios G_{M1} (Capítulo 26) do epitélio intestinal, e uma subunidade A catalítica, que entra na célula. A subunidade A catalisa a modificação covalente de uma proteína $G_{\alpha s}$: a subunidade α é modificada pela fixação de uma ADP-ribose a um resíduo de arginina. Essa modificação estabiliza a forma da $G_{\alpha s}$ ligada ao GTP, mantendo a molécula em sua

conformação ativa. Por sua vez, a proteína G ativa provoca ativação contínua da proteína quinase A. A PKA abre um canal de cloreto e inibe a absorção de sódio pelo trocador de Na^+-H^+ ao fosforilar tanto o canal quanto o trocador. O resultado final da fosforilação consiste em perda excessiva de NaCl e perda de grandes quantidades de água no intestino. Os pacientes que sofrem de cólera podem perder até o dobro de seu peso corporal em líquido em 4 a 6 dias. O tratamento consiste em reidratação com uma solução de glicose e eletrólitos.

Enquanto o cólera resulta da retenção de uma proteína G na sua conformação ativa, fazendo com que a via de transdução de sinais seja perpetuamente estimulada, a coqueluche é o resultado da situação oposta. A toxina da coqueluche também acrescenta uma unidade de ADP-ribose – neste caso, a uma proteína $G_{\alpha i}$, uma proteína G_α que inibe a adenilato ciclase, fecha os canais de Ca^{2+} e abre os canais de K^+. Entretanto, o efeito dessa modificação consiste em reduzir a afinidade da proteína G pelo GTP, retendo-a efetivamente na conformação inativa. Os sintomas pulmonares ainda não foram atribuídos a determinado alvo da proteína $G_{\alpha i}$. A toxina da coqueluche é secretada pela *Bordetella pertussis*, a bactéria responsável pela coqueluche.

Resumo

Nos seres humanos e em outros organismos multicelulares, moléculas de sinalização específicas são liberadas por células de um órgão e percebidas por células em outros órgãos do corpo. A mensagem iniciada por um ligante extracelular é convertida em alterações específicas no metabolismo ou na expressão gênica por meio de redes frequentemente complexas, designadas como vias de transdução de sinais. Essas vias amplificam o sinal inicial e levam a mudanças nas propriedades de moléculas efetoras específicas.

14.1 As proteínas G heterotriméricas transmitem sinais e se restabelecem

A epinefrina liga-se a uma proteína de superfície celular, denominada receptor β-adrenérgico. Esse receptor é um membro da família de receptores com sete hélices transmembrânicas, assim denominados porque cada receptor tem sete α-hélices que atravessam a membrana celular de um lado ao outro. Quando a epinefrina se liga ao receptor β-adrenérgico no lado extracelular, o receptor sofre uma mudança conformacional, que é percebida no interior da célula por uma proteína sinalizadora, denominada proteína G heterotrimérica. A subunidade α da proteína G troca uma molécula de GDP ligada por GTP e libera concomitantemente o heterodímero constituído das subunidades β e γ. A subunidade α na forma com GTP liga-se em seguida à adenilato ciclase e a ativa, levando a um aumento na concentração do segundo mensageiro, o AMP cíclico. Por sua vez, esse aumento na concentração de AMP cíclico ativa a proteína quinase A. Outros receptores 7TM também sinalizam por meio de proteínas G heterotriméricas, embora essas vias frequentemente incluam enzimas distintas da adenilato ciclase. Uma via proeminente, a via de fosfoinositídio, leva à ativação da fosfolipase C, que cliva um lipídio de membrana, produzindo dois segundos mensageiros, o diacilglicerol e o inositol 1,4,5-trifosfato. A concentração aumentada de IP_3 leva à liberação de íons cálcio, outro segundo mensageiro importante, dentro da célula. A sinalização da proteína G é concluída pela hidrólise do GTP ligado a GDP.

14.2 Sinalização da insulina | As cascatas de fosforilação são fundamentais para muitos processos de transdução de sinais

As proteína quinases são componentes essenciais em muitas vias de transdução de sinais, incluindo algumas para as quais a proteína quinase é um componente integral do receptor inicial. Um exemplo desse tipo de receptor é a tirosina quinase de membrana, ligada pela insulina. A ligação da insulina faz com que uma subunidade dentro do receptor dimérico fosforile resíduos específicos de tirosina na outra subunidade. As mudanças conformacionais resultantes aumentam acentuadamente a atividade de quinase do receptor. O receptor quinase ativado inicia uma cascata de quinases, que inclui tanto lipídio quinases quanto proteína quinases. Essa cascata acaba levando à mobilização de transportadores de glicose para a superfície da célula, aumentando a captação de glicose. A sinalização da insulina é concluída pela ação de fosfatases.

14.3 Sinalização do EGF | As vias de transdução de sinais são preparadas para responder

São necessárias apenas modificações mínimas para transformar muitas proteínas de transdução de sinais de suas formas inativas em formas ativas. O fator de crescimento epidérmico também sinaliza por meio de um receptor de tirosina quinase. A ligação do EGF induz uma mudança conformacional que possibilita a dimerização do receptor e a fosforilação cruzada. O receptor fosforilado liga-se a proteínas adaptadoras que medeiam a ativação da Ras, uma proteína G pequena. A Ras ativada inicia uma cascata de proteína quinases, que leva finalmente à fosforilação de fatores de transcrição e a alterações na expressão gênica. A sinalização do EGF é concluída pela ação de fosfatases e pela hidrólise do GTP pela Ras.

14.4 Muitos elementos reaparecem com variações em diferentes vias de transdução de sinais

As proteína quinases participam de muitas vias de transdução de sinais, tanto como componentes de receptores quanto em outras funções. Os segundos mensageiros, incluindo nucleotídios cíclicos, cálcio e derivados de lipídios, são comuns em muitas vias de sinalização. As mudanças nas concentrações de segundos mensageiros são frequentemente muito maiores do que as alterações associadas ao sinal inicial, devido aos processos de amplificação. Existem pequenos domínios que reconhecem resíduos de fosfotirosina ou lipídios específicos em muitas proteínas de sinalização, que são essenciais para determinar a especificidade das interações.

14.5 Defeitos nas vias de transdução de sinais podem levar ao câncer e a outras doenças

Genes que codificam componentes das vias de transdução de sinais que controlam o crescimento celular frequentemente são mutados no câncer. Alguns genes podem ser mutados a formas denominadas oncogenes, que são ativos independentemente de sinais apropriados. Foram desenvolvidos anticorpos monoclonais direcionados contra receptores de superfície celular que participam na sinalização para uso no tratamento do câncer. A compreensão da base molecular do câncer está levando ao desenvolvimento de agentes antineoplásicos direcionados contra alvos específicos, como o Gleevec, um inibidor de quinase específico.

Palavras-chave

adenilato ciclase (p. 408)
braço de dimerização (p. 418)
calmodulina (p. 412)
cascata de fosfoinositídio (p. 410)
comunicação cruzada (p. 404)
domínio de homologia Src 2 (SH2) (p. 416)
domínio de homologia Src 3 (SH3) (p. 419)
fator de crescimento epidérmico (EGF) (p. 417)
fator de troca de nucleotídios de guanina (GEF) (p. 419)
fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) (p. 410)
fosfolipase C (p. 410)
gene supressor tumoral (p. 422)
insulina (p. 413)
ligante (p. 404)
mão EF (p. 412)
oncogene (p. 422)
primeiro mensageiro (p. 404)
proteína adaptadora (p. 416)
proteína ativadora de GTPase (GAP) (p. 420)
proteína G (p. 407)
proteína G pequena (p. 419)
proteína quinase A (PKA) (p. 408)
proteína quinase C (PKC) (p. 411)
proteína quinase dependente de calmodulina (quinase CaM) (p. 413)
proto-oncogene (p. 422)
quinase do receptor beta-adrenérgico (p. 410)
quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK) (p. 420)
Ras (p. 408)
receptor acoplado à proteína G (GPCR) (p. 406)
receptor beta-adrenérgico (b-AR) (p. 406)
receptor com sete hélices transmembrânicas (7TM) (p. 406)
receptor de EGF (EGFR) (p. 417)
receptor de insulina (p. 414)
receptor de tirosina quinase (p. 414)
rodopsina (p. 406)
segundo mensageiro (p. 404)
substrato do receptor de insulina (IRS) (p. 415)
tirosina quinase (p. 414)

Questões

1. *Mutantes ativos*. Algumas proteína quinases são inativas, a não ser que sejam fosforiladas em resíduos-chave de serina ou treonina. Em alguns casos, podem ser produzidas enzimas ativas pela mutação desses resíduos de serina ou treonina em glutamato. Explique.

2. *No bolso*. Os domínios SH2 ligam-se a resíduos de fosfotirosina em bolsas profundas de sua superfície. Você esperaria que os domínios SH2 se ligassem com alta afinidade à fosfosserina ou fosfotreonina com alta afinidade? Por que sim ou por que não?

3. *Ligado-desligado.* Por que a atividade de GTPase das proteínas G é crucial para o funcionamento apropriado de uma célula? Por que as proteínas G não evoluíram para catalisar a hidrólise do GTP mais eficientemente?

4. *Vive la différence*. Por que a ligação de um hormônio monomérico a duas moléculas idênticas de receptor, promovendo, assim, a formação de um dímero de receptor, é considerada notável?

5. *Anticorpos imitando hormônios*. Os anticorpos têm dois sítios idênticos de ligação de antígenos. De modo notável, os anticorpos dirigidos contra as partes extracelulares dos receptores de fatores de crescimento frequentemente levam aos mesmos efeitos celulares do que a exposição aos fatores de crescimento. Explique essa observação.

6. *Troca fácil*. Foi identificada uma forma mutante da subunidade α da proteína G heterotrimérica. Essa forma troca prontamente nucleotídios, mesmo na ausência de um receptor ativado. Qual seria o efeito sobre uma via de sinalização contendo a subunidade α mutante?

7. *Estabelecendo conexões.* Suponha que você fosse investigar uma via de transdução de sinais de fatores de crescimento recém-descoberta. Você verifica que, ao adicionar GTPγS, um análogo não hidrolisável do GTP, a duração da resposta hormonal é aumentada. O que você pode concluir?

8. *Velocidades de difusão*. Normalmente, as velocidades de difusão variam inversamente com os pesos moleculares; por conseguinte, moléculas menores difundem-se mais rapidamente do que as maiores. Todavia, nas células, os íons cálcio difundem mais lentamente do que o cAMP. Proponha uma possível explicação.

9. *Negatividade em abundância*. O Fura-2 não é efetivo para o estudo dos níveis de cálcio nas células vivas intactas. Baseando-se na descrição do Fura-2 na p. 412, por que ele é ineficaz?

10. *Inundado com glicose*. A glicose é mobilizada para a geração de ATP no músculo em resposta à epinefrina, que ativa a $G_{\alpha s}$. A AMP cíclico fosfodiesterase é uma enzima que converte o cAMP em AMP. Como os inibidores da cAMP fosfodiesterase afetariam a mobilização da glicose no músculo?

11. *Dando o início.* O receptor de insulina, ao ser dimerizado, efetua a fosforilação cruzada da alça de ativação da outra molécula de receptor, levando à ativação da quinase. Proponha como esse evento de fosforilação pode ocorrer se a quinase começa em uma fosforilação em uma conformação inativa.

12. *Muitos defeitos*. Consideráveis esforços foram envidados para determinar os genes em que variações de sequência contribuem para o desenvolvimento do diabetes tipo 2. Foram implicados cerca de 800 genes. Proponha uma explicação para essa observação.

13. *Sinalização do fator de crescimento*. O hormônio de crescimento humano liga-se a uma proteína de membrana da superfície celular, que não é um receptor tirosina quinase. O domínio intracelular do receptor pode ligar-se a outras proteínas dentro da célula. Além disso, estudos indicam que o receptor é monomérico na ausência de hormônio, porém dimeriza ao se ligar ao hormônio. Proponha um mecanismo possível para a sinalização do hormônio de crescimento.

14. *Truncamento de receptor*. Você está preparando uma linhagem celular que hiperexpressa uma forma mutante do EGFR, em que houve deleção de toda a região intracelular do receptor. Preveja o

efeito da hiperexpressão dessa construção sobre a sinalização do EGF nessa linhagem celular.

15. *Híbrido*. Suponha que, por meio de manipulações genéticas, seja produzido um receptor quimérico, constituído do domínio extracelular do receptor de insulina e dos domínios transmembrânico e intracelular do receptor de EGF. As células que expressam esse receptor são expostas à insulina, e examina-se o nível de fosforilação do receptor quimérico. O que você esperaria observar e por quê? O que você esperaria observar se essas células fossem expostas ao EGF?

16. *Amplificação total*. Suponha que cada receptor betaadrenérgico ligado à epinefrina converta 100 moléculas de $G_{\alpha s}$ em suas formas com GTP, e que cada molécula de adenilato ciclase ativada produza 1.000 moléculas de cAMP por segundo. Supondo uma resposta completa, quantas moléculas de cAMP serão produzidas em 1 s após a formação de um único complexo entre a epinefrina e o receptor beta-adrenérgico?

Questões | Integração de capítulos

17. *Via do fator de crescimento do nervo*. O fator de crescimento do nervo (NGF) liga-se a um receptor acoplado a uma tirosina quinase. A quantidade de diacilglicerol na membrana plasmática aumenta nas células que expressam esse receptor, quando tratadas com NGF. Proponha uma via de sinalização simples e identifique a isoforma de quaisquer enzimas participantes. Você esperaria um aumento das concentrações de quaisquer outros segundos mensageiros comuns após tratamento com o NGF?

18. *Redundância*. Em virtude do elevado grau de variabilidade genética nos tumores, tipicamente não existe nenhuma terapia antineoplásica isolada que seja universalmente efetiva para todos os pacientes, mesmo com um tipo específico de tumor. Por conseguinte, é frequentemente desejável inibir uma via particular em mais de um ponto na cascata de sinalização. Além do cetuximabe, um anticorpo monoclonal dirigido contra EGFR, proponha estratégias alternativas direcionadas contra a via de sinalização do EGF para desenvolvimento de fármacos antitumorais.

Questões sobre mecanismo

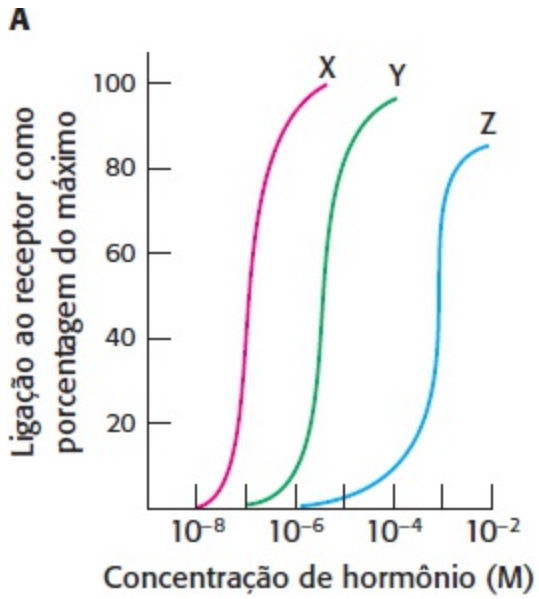
19. *Parentes distantes*. A estrutura da adenilato ciclase assemelha-se às estruturas de alguns tipos de DNA polimerases, sugerindo que essas enzimas tiveram origem a partir de um ancestral comum. Compare as reações catalisadas por essas duas enzimas. De que modo elas são semelhantes?

20. *Inibidores da quinase como fármacos*. A análise funcional e estrutural indica que o Gleevec é um inibidor competitivo do ATP na Bcr-Abl quinase. Com efeito, muitos inibidores de quinases em fase de investigação ou atualmente comercializados como fármacos são inibidores competitivos do ATP. Você pode sugerir uma desvantagem potencial de fármacos que utilizam esse mecanismo específico de ação?

Questões | Interpretação de dados

21. *Estabelecendo a especificidade*. Você deseja determinar a especificidade de ligação a hormônios

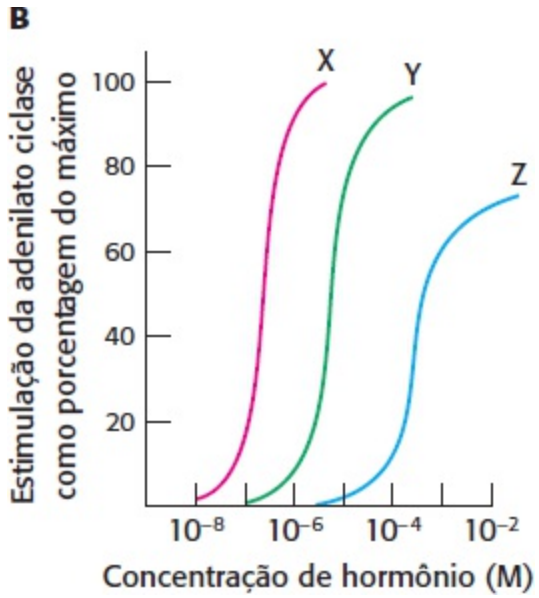
de um receptor de membrana recentemente identificado. Três hormônios diferentes, X, Y e Z foram misturados com o receptor em experimentos isolados, e a porcentagem de capacidade de ligação do receptor foi determinada em função da concentração de hormônio, como mostra o gráfico A.



(a) Que concentrações de cada hormônio resultam em 50% de ligação máxima?

(b) Qual hormônio exibe a maior afinidade de ligação ao receptor?

Em seguida, você deseja determinar se o complexo hormônio-receptor estimula a cascata da adenilato ciclase. Para isso, você mede a atividade da adenilato ciclase em função da concentração de hormônio, como mostra o gráfico B.

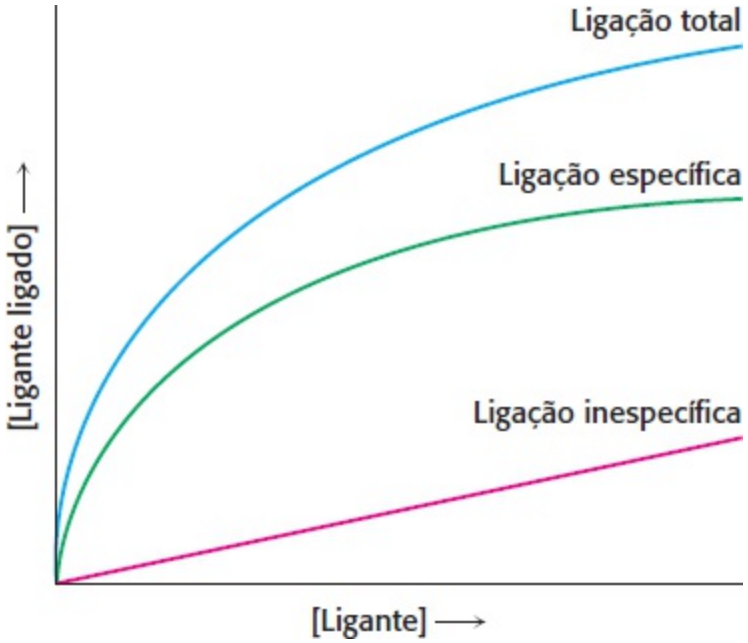


(c) Qual é a relação entre a afinidade de ligação do complexo hormônio-receptor e a capacidade do hormônio de aumentar a atividade da adenilato ciclase? O que você pode concluir acerca do mecanismo de ação do complexo hormônio-receptor?

(d) Sugira experimentos que poderiam determinar se uma proteína $G_{\alpha s}$ é um componente da via de transdução de sinais.

22. *Questões de ligação*. Um cientista deseja determinar o número de receptores específicos para um

ligante X, que ele possui na forma tanto radioativa quanto não radioativa. Em um experimento, ele adiciona quantidades crescentes de X radioativo e mede a quantidade ligada às células. O resultado é mostrado como atividade total no gráfico a seguir. Em seguida, ele realiza o mesmo experimento, exceto que inclui um excesso de várias centenas de vezes de X não radioativo. Esse resultado é mostrado como ligação inespecífica. A diferença entre as duas curvas é a ligação específica.



(a) Por que a ligação total não é uma representação acurada do número de receptores na superfície celular?

(b) Qual é o propósito de executar o experimento na presença de um excesso de ligante não radioativo?

(c) Qual é o significado do fato de a ligação especifica alcançar um platô?

23. *Contando os receptores*. Com a utilização de experimentos como aqueles descritos nas questões 21 e 22, é possível calcular o número de receptores presentes na membrana celular. Suponha que a atividade específica do ligante seja de 10^{12} cpm por milimol, e que a ligação específica máxima seja de 10^4 cpm por miligrama por proteína de membrana. Existem 10^{10} células por miligrama de proteína de membrana. Suponha que haja ligação de um ligante por receptor. Calcule o número de moléculas de receptor presentes por célula.

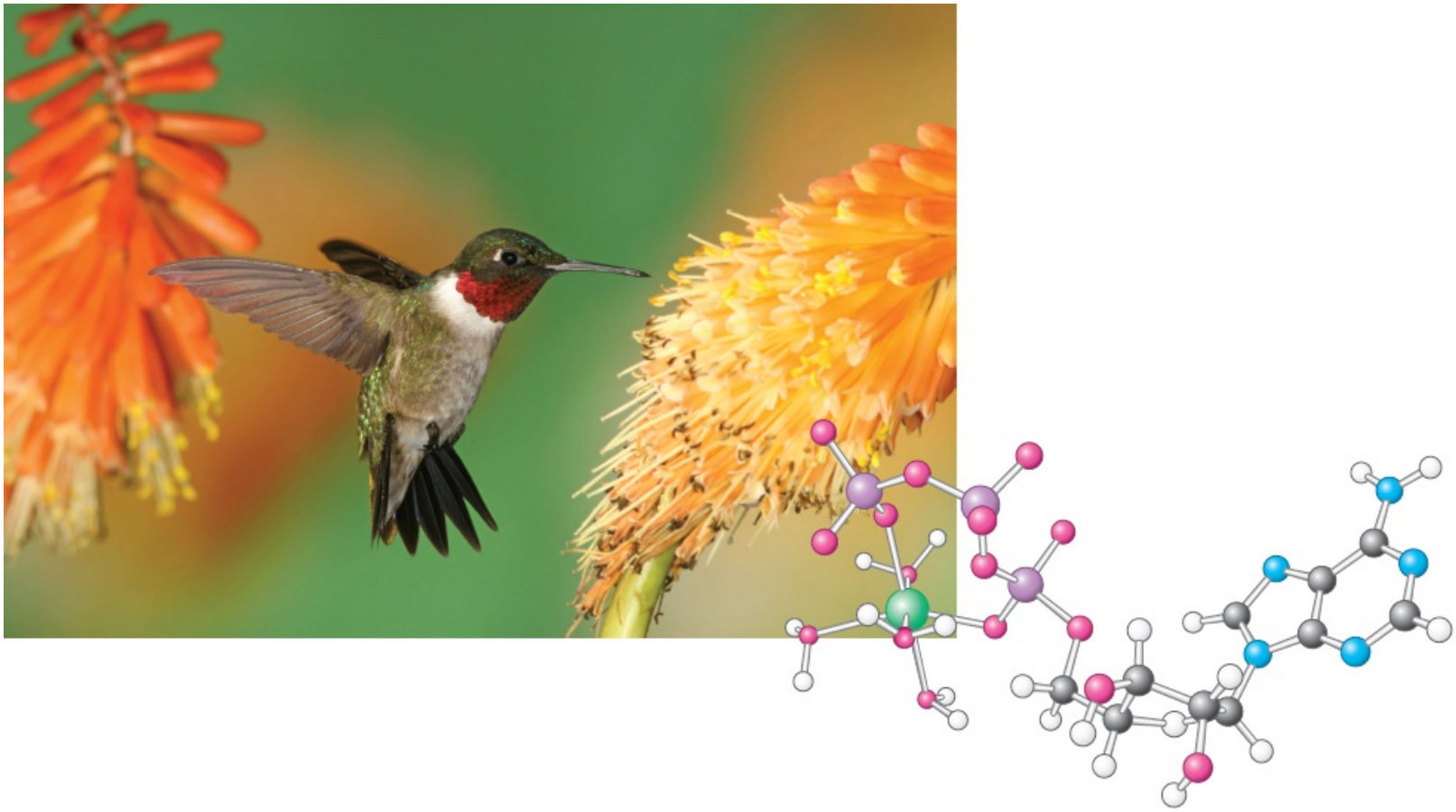
*N.R.T.: Algumas isoformas das proteínas quinase C não necessitam de cálcio para se ligarem ao DAG, sendo cálcio-independentes. As proteína quinases C dependentes de cálcio são da família das clássicas.

Parte 2

Transdução e Armazenamento de Energia

Metabolismo | Esboço e Conceitos Básicos

15



Os beija-flores são capazes de prodígios de resistência. Por exemplo, o pequeno beija-flor-de-papo-vermelho consegue armazenar energia suficiente para voar através do Golfo do México, uma distância em torno de 800 quilômetros, sem repousar. Esta façanha é possível graças à sua capacidade de transformar fontes energéticas em ATP (forma de energia usada por todas as células), representado pelo modelo à direita [(Esquerda) William Leaman/Alamy.]

SUMÁRIO

15.1 O metabolismo é composto por muitas reações acopladas e interconectadas

15.2 ATP é a forma universal de energia livre usada pelos sistemas biológicos

15.3 A oxidação de fontes de carbono é um gerador importante de energia celular

15.4 As vias metabólicas contêm muitos padrões (*motifs*) recorrentes

Os conceitos de conformação e dinâmica desenvolvidos na Parte 1, especialmente aqueles aplicados à especificidade e ao poder catalítico das enzimas, à regulação de sua atividade catalítica e ao transporte de moléculas e de íons através de membranas, possibilitam-nos agora formular questões fundamentais em bioquímica:

1. *Como a célula extrai energia e poder redutor de seu ambiente?*

2. *Como a célula sintetiza os elementos formadores de suas macromoléculas e, a partir daí, as próprias macromoléculas?*

Estes processos são executados por uma rede extremamente integrada de reações químicas que são coletivamente conhecidas como *metabolismo* ou *metabolismo intermediário.*

Mais de mil reações químicas ocorrem mesmo em um organismo simples como a bactéria *Escherichia coli*. A variedade de reações é, a primeira vista, impressionante. Contudo, um exame mais atento revela que o metabolismo tem um *projeto coerente com muitos* padrões *em comum*. Estes padrões incluem a utilização de uma forma de energia comum a todas as formas de vida e o aparecimento repetido de um número limitado de intermediários ativados. De fato, um grupo de cerca de 100 moléculas desempenha funções fundamentais em todas as formas de vida. Além disso, embora o número de reações metabólicas seja grande, o número de *tipos* de reações é pequeno e os mecanismos destes são geralmente bem simples. As vias metabólicas são também reguladas por modos comuns. O propósito deste capítulo é apresentar alguns princípios gerais e padrões do metabolismo para fornecer um alicerce para futuros estudos mais detalhados. Estes princípios são:

1. Compostos energéticos são degradados e grandes moléculas são construídas passo a passo em uma série de reações encadeadas chamadas de *vias metabólicas*.

2. Uma fonte de energia comum a todas as formas de vida, o trifosfato de adenosina (ATP), une as vias liberadoras de energia com as vias consumidoras de energia.

3. A oxidação de fontes de carbono promove a formação de ATP.

4. Embora existam muitas vias metabólicas, elas geralmente têm um número limitado de tipos de reações e intermediários característicos.

5. As vias metabólicas são altamente reguladas.

15.1 O metabolismo é composto por muitas reações acopladas e interconectadas

Os organismos vivos necessitam de um aporte contínuo de energia para três propósitos principais: (1) o desempenho do trabalho mecânico na contração muscular e nos movimentos celulares, (2) o transporte ativo de moléculas e de íons e (3) a síntese de macromoléculas e de outras biomoléculas a partir de precursores simples. A energia livre utilizada nestes processos, que mantém um organismo em um estado que está longe do equilíbrio, provém do meio ambiente. Organismos fotossintéticos (*fototróficos*) obtêm esta energia graças à captação da energia solar, enquanto os *quimiotróficos*, que incluem os animais, obtêm energia por meio da oxidação dos alimentos gerados pelos fototróficos.

O metabolismo é constituído por reações que produzem energia e por outras que consomem energia

O *metabolismo* é essencialmente uma série de reações químicas encadeadas que começa com uma

determinada molécula e a converte em outra molécula (ou moléculas) de um modo cuidadosamente definido (Figura 15.1). Na célula existem muitas dessas vias metabólicas (Figura 15.2); mais adiante examinaremos algumas delas com mais detalhes. Estas vias são interdependentes, e sua atividade é coordenada por meios extremamente sensíveis de comunicação nos quais predominam enzimas alostéricas (Seção 10.1). Vimos os fundamentos desta comunicação no Capítulo 14.

Podemos dividir as vias metabólicas em duas classes amplas: (1) as que convertem energia a partir de fontes energéticas em formas biologicamente úteis e (2) as que requerem energia para ocorrerem. Embora esta divisão seja com frequência imprecisa, é, contudo, uma distinção útil no exame do metabolismo. As reações que transformam combustíveis em energia celular são chamadas de *reações catabólicas* ou, mais em geral, *catabolismo*.

$$\text{Combustível (carboidratos, gorduras)} \xrightarrow{\text{Catabolismo}} CO_2 + H_2O + \text{energia útil}$$

As reações que demandam energia, como a síntese de glicose, gorduras ou DNA, são ditas *reações anabólicas* ou *anabolismo.* As formas úteis de energia que são produzidas no catabolismo são empregadas no anabolismo para produzir estruturas complexas a partir das mais simples ou estados ricos em energia a partir de estados pobres em energia.

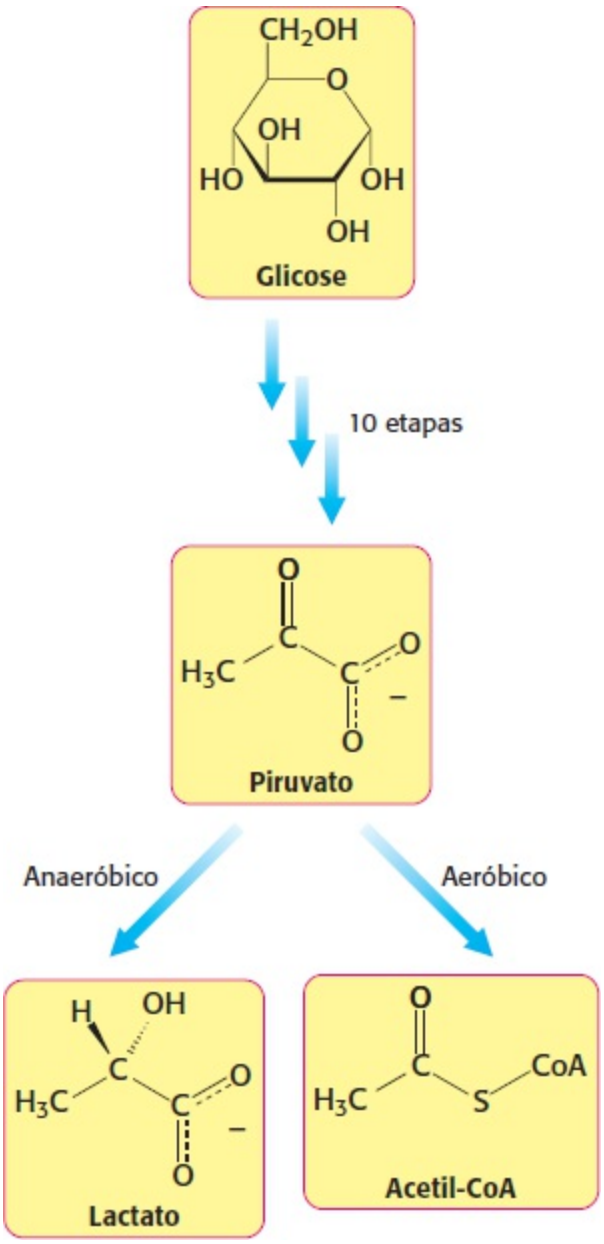


Figura 15.1 Metabolismo da glicose. A glicose é metabolizada a piruvato em 10 reações encadeadas. Em condições anaeróbicas, o piruvato é metabolizado a lactato e, em condições aeróbicas, a acetil-CoA. Os carbonos da acetil-CoA derivados da glicose são, a seguir, oxidados a CO_2.

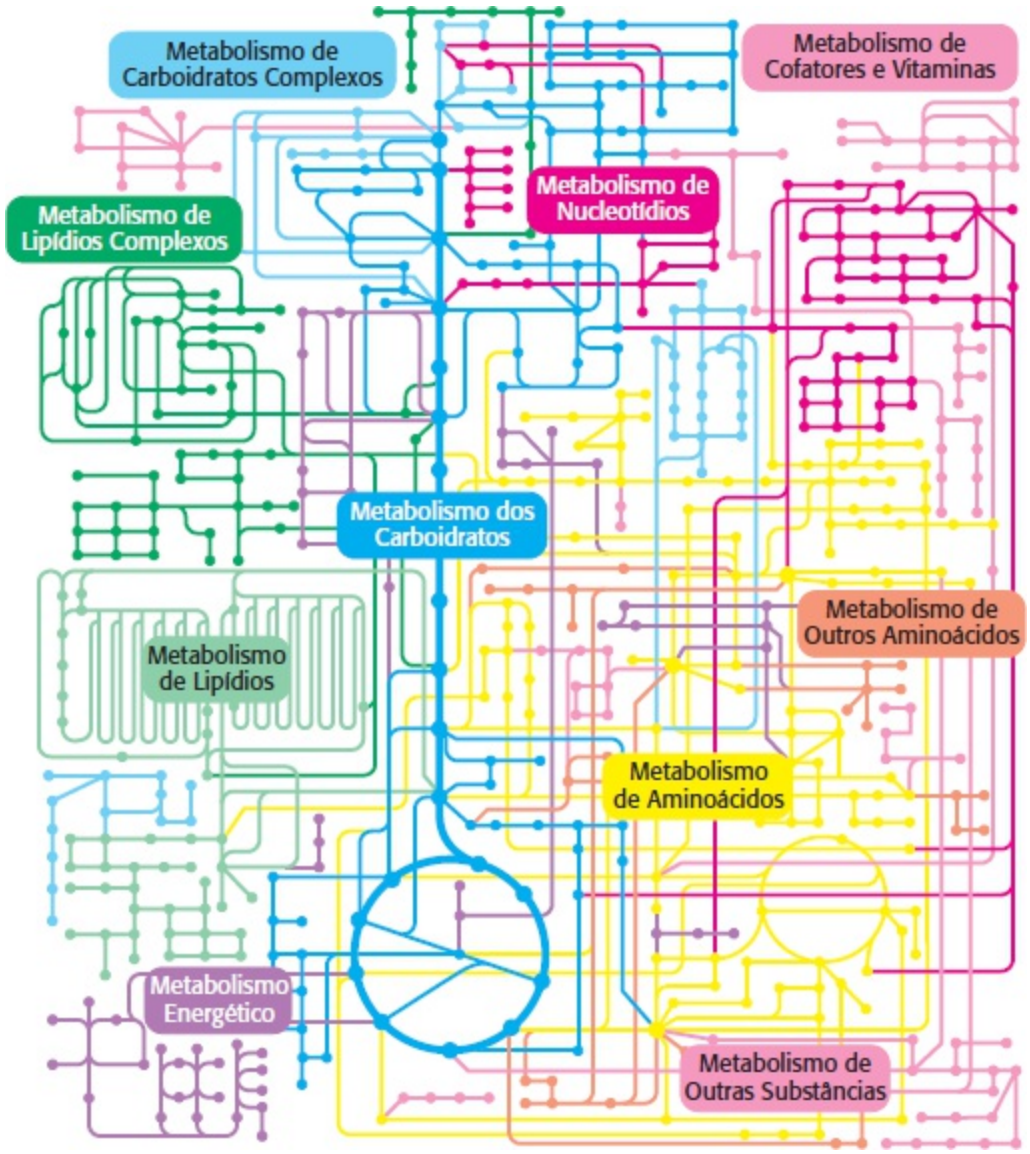


Figura 15.2 Vias metabólicas. [De Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (www.genome.ad.jp/kegg).]

$$\text{Energia útil + precursores simples} \xrightarrow{\text{Anabolismo}} \text{moléculas complexas}$$

Algumas vias podem ser anabólicas ou catabólicas, dependendo das condições energéticas da célula. Elas são denominadas vias *anfibólicas*.

Um importante princípio do metabolismo é que *as vias biossintéticas e as vias degradativas são quase sempre diferentes*. É necessária esta separação por motivos energéticos, como se evidenciará nos capítulos seguintes. Ela também facilita o controle do metabolismo.

Uma reação termodinamicamente desfavorável pode ser impulsionada por uma reação favorável

Como as vias metabólicas específicas são "construídas" a partir das reações individuais? Uma via metabólica tem de satisfazer pelo menos dois critérios: (1) as reações individuais têm de ser *específicas* e (2) o conjunto inteiro de reações que constitui a via tem de ser *termodinamicamente*

favorável. Uma reação específica originará somente um produto particular ou um conjunto de produtos característicos a partir de seus reagentes. Como abordado no Capítulo 8, uma das funções das enzimas é fornecer esta especificidade. A termodinâmica do metabolismo é mais prontamente abordada em termos de energia livre, que foi também abordada no Capítulo 8. Uma reação só consegue ocorrer espontaneamente se ΔG, a variação da energia livre, for negativa. Relembre que ΔG para formação dos produtos C e D a partir dos substratos A e B é dada por

$$\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

Portanto, ΔG de uma reação depende da *natureza* dos reagentes e produtos (expressa como $\Delta G^{o\prime}$, a variação padrão de energia livre) e de suas *concentrações* (expressas pelo segundo termo).

Um fato importante em termos termodinâmicos é *que a variação global de energia livre para uma série de reações acopladas é igual ao somatório das variações de energia livre das etapas individuais*. Consideremos as seguintes reações:

$A \rightleftharpoons B + C$	$\Delta G^{\circ\prime} = +21\ kJ\ mol^{-1}\ (+5\ kcal\ mol^{-1})$
$B \rightleftharpoons D$	$\Delta G^{\circ\prime} = -34\ kJ\ mol^{-1}\ (-8\ kcal\ mol^{-1})$
$A \rightleftharpoons C + D$	$\Delta G^{\circ\prime} = -13\ kJ\ mol^{-1}\ (-3\ kcal\ mol^{-1})$

Em condições padrão, A não pode ser convertido espontaneamente em B e C, porque $\Delta G^{o\prime}$ é positivo. Contudo, a transformação de B em D em condições padrões é termodinamicamente factível. Visto que as variações de energia livre são aditivas, a conversão de A em C e D tem uma $\Delta G^{o\prime}$ de –13 kJ mol^{-1} (–3 kcal mol^{-1}), o que significa que ela ocorre espontaneamente em condições padrão. Portanto, *uma reação termodinamicamente desfavorável pode ser impulsionada por uma termodinamicamente favorável que a ela esteja acoplada.* Neste exemplo, as reações são acopladas pelo intermediário químico comum B. Assim, as vias metabólicas são formadas pelo acoplamento de reações catalisadas por enzimas, de modo que a energia livre global da via é negativa.

15.2 ATP é a forma universal de energia livre usada pelos sistemas biológicos

O metabolismo celular é facilitado pelo uso de uma forma de energia comum a todos os sistemas, a *adenosina trifosfato* (ATP). Parte da energia livre proveniente da oxidação dos alimentos e da luz é transformada nesta molécula altamente acessível, que atua como doadora de energia livre na maioria dos processos que requerem energia, como movimento, transporte ativo e biossínteses. De fato, a maior parte do catabolismo consiste em reações que extraem energia dos combustíveis, como carboidratos e lipídios, e a convertem em ATP.

A hidrólise do ATP é exergônica

O ATP é um nucleotídio constituído por uma adenina, uma ribose e uma unidade trifosfato (Figura 15.3). Sua forma ativa é geralmente um complexo de ATP com Mg^{2+} ou Mn^{2+}. Ao considerarmos o papel do ATP como carreador de energia, podemos nos concentrar em sua unidade trifosfato. *ATP é uma molécula rica em energia porque sua unidade trifosfato contém duas ligações de*

fosfoanidrido. Uma grande quantidade de energia livre é liberada quando o ATP é hidrolisado a adenosina difosfato (ADP) e ortofosfato (P_i) ou quando ATP é hidrolisado a adenosina monofosfato (AMP) e pirofosfato (PP_i).

$$ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + P_i$$
$$\Delta G^{\circ\prime} = -30{,}5 \text{ kJ mol}^{-1} (-7{,}3 \text{ kcal mol}^{-1})$$

$$ATP + H_2O \rightleftharpoons AMP + PP_i$$
$$\Delta G^{\circ\prime} = -45{,}6 \text{ kJ mol}^{-1} (-10{,}9 \text{ kcal mol}^{-1})$$

O valor preciso de $\Delta G^{\circ\prime}$ para estas reações depende da força iônica do meio e das concentrações de Mg^{2+} e de outros íons metálicos. Nas concentrações celulares típicas, o valor real de ΔG para estas hidrólises é de aproximadamente –50 kJ mol^{-1} (–12 kcal mol^{-1}).

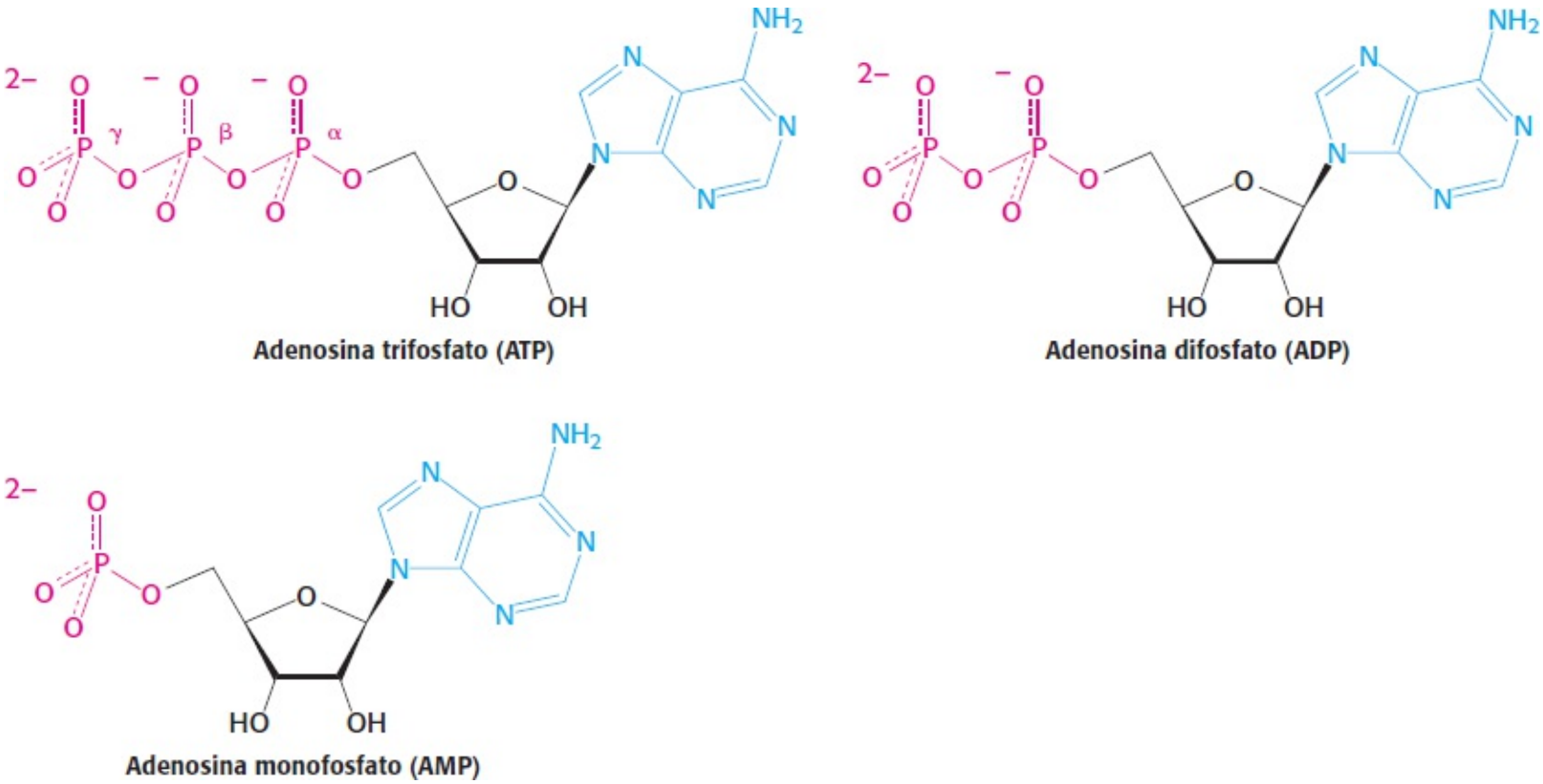


Figura 15.3 Estruturas do ATP, ADP e AMP. Estes adenilatos consistem em adenina (azul), uma ribose (preto) e uma unidade tri, di ou monofosfato (vermelho). O átomo de fósforo mais interno é chamado de P_α; o mediano, de P_β; e o mais externo, de P_γ.

A energia liberada na hidrólise do ATP impulsiona reações que demandam o aporte de energia livre, como a contração muscular. Por sua vez, forma-se ATP a partir de ADP e P_i quando as moléculas energéticas (combustível) são oxidadas nos seres quimiotróficos ou quando a luz é aprisionada pelos fototróficos. *Este ciclo ATP-ADP é o modo fundamental da troca de energia nos sistemas biológicos.*

Algumas reações de biossíntese são impulsionadas pela hidrólise de nucleosídios trifosfatos análogos ao ATP, a saber, guanosina trifosfato (GTP), uridina trifosfato (UTP) e citidina trifosfato (CTP). As formas difosfato destes nucleotídios são denominadas GDP, UDP e CDP e as monofosfato, GMP, UMP e CMP. Enzimas catalisam a transferência do grupo fosforila terminal de um nucleotídio para outro. A fosforilação de nucleosídios monofosfato é catalisada por uma família de *nucleosídio*

monofosfato quinases, como abordado na Seção 9.4. A fosforilação de nucleosídios difosfatos é catalisada pela nucleosídio difosfato quinase, uma enzima com ampla especificidade.

$$\text{NMP} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{Nucleosídio monofosfato quinase}} \text{NDP} + \text{ADP}$$

Nucleosídio monofosfato

$$\text{NDP} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{Nucleosídio difosfato quinase}} \text{NTP} + \text{ADP}$$

Nucleosídio difosfato

Curiosamente, embora todos os nucleotídios trifosfato sejam energeticamente equivalentes, o ATP é o principal carreador celular de energia. Além disso, dois importantes carreadores de elétrons, NAD^+ e FAD, derivam do ATP. *A participação do ATP no metabolismo energético é proeminente.*

A hidrólise do ATP impulsiona o metabolismo por deslocar o equilíbrio das reações acopladas

Uma reação desfavorável pode ocorrer pelo seu acoplamento à hidrólise do ATP. Considere uma reação química que seja termodinamicamente desfavorável se não houver um aporte de energia livre, uma situação comum a muitas reações de biossíntese. Admita que a energia livre padrão da transformação do composto A em composto B seja de + 16,7 kJ mol^{-1} (+ 4,0 kcal mol^{-1}):

$$\text{A} \rightleftharpoons \text{B} \quad \Delta G^{\circ\prime} = +16{,}7 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ (+4 kcal mol}^{-1}\text{)}$$

A constante de equilíbrio K'_{eq} desta reação a 25°C está relacionada com $\Delta G^{o\prime}$ (em unidades de quilojoules por mol) por:

$$K'_{eq} = [\text{B}]_{eq}/[\text{A}]_{eq} = 10^{-\Delta_{Go'}/5{,}69} = 1{,}15 \times 10^{-3}$$

Assim, a conversão efetiva de A em B não pode ocorrer quando a razão molar entre B e A é igual ou superior a $1{,}15 \times 10^{-3}$. Entretanto, A pode ser convertido em B nestas condições se a reação for acoplada à hidrólise de ATP. Em condições padrões, $\Delta G^{o\prime}$ da hidrólise é aproximadamente –30,5 kJ mol^{-1} (–7,3 kcal mol^{-1}). A nova reação global é:

$$\text{A} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{B} + \text{ATP} + \text{P}_\text{i}$$

$$\Delta G^{o\prime} = -13{,}8 \text{ kJ mol}^{-1}(-3{,}3 \text{ kcal mol}^{-1)}$$

Sua variação de energia livre de –13,8 kJ mol^{-1} (–3,3 kcal mol^{-1}) é o somatório do valor de $\Delta G^{o\prime}$ para a conversão de A em B [+ 16,7 kJ $mmol^{-1}$ (+4,0 kcal mol^{-1})] e o valor de $\Delta G^{o\prime}$ para a hidrólise do ATP [–30,5 kJ mol^{-1} (–7,3 kcal mol^{-1})]. Em pH 7, a constante de equilíbrio desta reação acoplada é:

$$K'_{eq} = \frac{[\text{B}]_{eq}}{[\text{A}]_{eq}} \times \frac{[\text{ADP}]_{eq}[\text{P}_\text{i}]_{eq}}{[\text{ATP}]_{eq}} = 10^{13{,}8/5{,}69} = 2{,}67 \times 10^2$$

No equilíbrio, a razão entre [A] e [B] é dada por:

$$\frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} = K'_{eq}\frac{[ATP]_{eq}}{[ADP]_{eq}[P_i]_{eq}}$$

o que significa que a hidrólise do ATP permite que A se converta em B até que a razão [B]/[A] alcance um valor de $2{,}67 \times 10^2$. Esta razão de equilíbrio é muito diferente do valor $1{,}15 \times 10^{-3}$ da reação A → B na ausência da hidrólise de ATP. Em outras palavras, o acoplamento da hidrólise de ATP com a conversão de A em B em condições padrões alterou a razão de equilíbrio entre B e A por um fator de aproximadamente 10^5. Se fossemos utilizar ΔG da hidrólise do ATP em condições celulares [–50,2 kJ mol^{-1} (–12 kcal mol^{-1})] em nossos cálculos, em vez de $\Delta G^{o'}$, a variação da razão de equilíbrio seria ainda maior (da ordem de 10^8).

Vemos aqui a essência termodinâmica da ação do ATP como *agente acoplador de energia.* As células mantêm alto nível de ATP pela utilização de substratos oxidáveis ou luz como fontes de energia livre para sintetizar a molécula. Na célula, a hidrólise de uma molécula de ATP em uma reação acoplada altera a razão de equilíbrio entre produtos e reagentes por um fator muito grande (da ordem de 10^8). Mais comumente, a hidrólise de *n* moléculas de ATP altera a razão de equilíbrio de uma reação acoplada (ou sequência de reações) por um fator de 10^{8n}. Por exemplo, a hidrólise de três moléculas de ATP em uma reação acoplada altera a razão de equilíbrio por um fator de 10^{24}. Portanto, *uma sequência de reações termodinamicamente desfavoráveis pode ser convertida em uma mais favorável, acoplando-a à hidrólise de um número suficiente de moléculas de ATP em uma nova reação.* Deve-se também salientar que A e B na reação acoplada precedente podem ser interpretados de forma mais ampla, não apenas como espécies químicas diferentes. Por exemplo, A e B podem representar conformações ativa e inativa de uma proteína que é ativada pela fosforilação com ATP. Mediante tais alterações na conformação proteica, "motores" moleculares como miosina, cinesina e dineína convertem a energia química do ATP em energia mecânica (Capítulo 34). De fato, esta conversão é a base da contração muscular.

Por outro lado, A e B podem ser concentrações de um íon ou de uma molécula fora e dentro de uma célula, como no transporte ativo de um nutriente. O transporte ativo de Na^+ e K^+ através de membranas é impulsionado pela fosforilação da bomba de sódio-potássio pelo ATP e sua subsequente desfosforilação (Seção 13.2).

O alto potencial de transferência de grupo fosforila do ATP resulta de diferenças estruturais entre o ATP e seus produtos de hidrólise

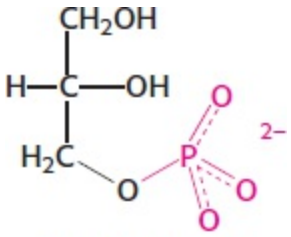
O que torna o ATP um doador de fosfato tão eficiente? Comparemos a energia livre padrão da hidrólise do ATP com a de um éster de fosfato, como o glicerol 3-fosfato:

$$ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + P_i$$
$$\Delta G^{o'} = -30{,}5 \text{ kJ mol}^{-1} (-7{,}3 \text{ kcal mol}^{-1})$$

$$\text{Glicerol 3-fosfato} + H_2O \rightleftharpoons \text{glicerol} + P_i$$
$$\Delta G^{o'} = -9{,}2 \text{ kJ mol}^{-1} (-2{,}2 \text{ kcal mol}^{-1})$$

A magnitude de $\Delta G^{o'}$ para a hidrólise do glicerol 3-fosfato é muito menor que a do ATP, o que significa que o ATP tem uma tendência muito mais forte para transferir seu grupo fosforila terminal para a água do que o glicerol 3-fosfato. Em outras palavras, ATP tem maior *potencial de*

transferência de grupo fosforila do que o glicerol 3-fosfato.



Glicerol 3-fosfato

O alto potencial de transferência de grupo fosforila do ATP pode ser explicado por características de sua estrutura. Como a $\Delta G^{o'}$ depende da *diferença* entre as energias livres dos produtos e reagentes, precisamos examinar a estrutura do ATP e dos seus produtos de hidrólise, ADP e P_i, para responder esta questão. Três fatores são importantes: *estabilização por ressonância, repulsão eletrostática* e *estabilização graças à hidratação.*

1. *Estabilização por ressonância*. ADP e, particularmente, P_i, têm muito maior estabilidade por ressonância do que ATP. O ortofosfato tem várias formas de ressonância de energia semelhante (Figura 15.4), enquanto o grupo fosforila γ do ATP tem um número bem menor. Formas iguais às mostradas na Figura 15.5 são desfavoráveis porque um átomo de oxigênio com carga elétrica positiva está adjacente a um átomo de fosforo com carga elétrica positiva, uma justaposição eletrostaticamente desfavorável.

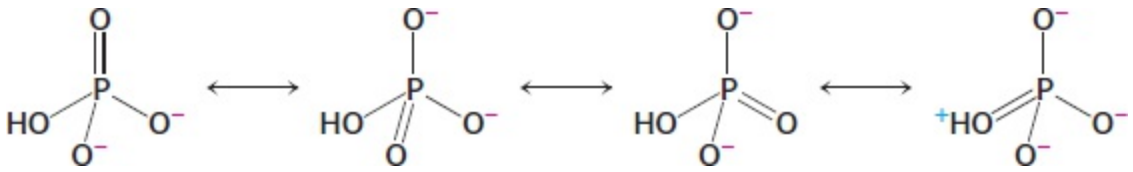


Figura 15.4 Estruturas de ressonância do ortofosfato.

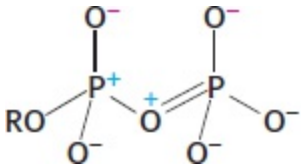


Figura 15.5 Estrutura improvável de ressonância. A estrutura contribui pouco para a parte terminal do ATP, porque as duas cargas elétricas positivas localizam-se adjacentes uma à outra.

2. *Repulsão eletrostática*. Em pH 7, a unidade trifosfato do ATP carreia aproximadamente quatro cargas elétricas negativas. Estas cargas elétricas se repelem umas as outras, por estarem muito próximas. A repulsão entre elas é reduzida quando o ATP é hidrolisado.

3. *Estabilização graças à hidratação.* Mais água consegue se ligar de modo mais efetivo ao ADP e ao Pi do que a parte fosfoanidrido do ATP, estabilizando o ADP e o P_i por hidratação.

O ATP é, com frequência, denominado um composto com fosfato de alta energia, e suas ligações fosfoanidrido são consideradas ligações ricas em energia. De fato, um símbolo (~P) é com frequência utilizado para indicar tal ligação. Entretanto, não há nada de especial acerca dessas

ligações; *elas são ricas em energia, pois muita energia é liberada quando são hidrolisadas*, por motivos listados nos fatores de 1 a 3.

O potencial de transferência de fosforila é uma forma importante de transformação da energia celular

As energias livres padrão de hidrólise promovem um meio conveniente de comparação entre os potenciais de transferência de fosforila de compostos fosforilados. Essas comparações revelam que o ATP não é o único composto de alto potencial de transferência de fosforila. De fato, alguns compostos nos sistemas biológicos têm um potencial de transferência de fosforila maior que o do ATP. Estes compostos incluem fosfoenolpiruvato (PEP), 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) e fosfocreatina (Figura 15.6). Portanto, PEP consegue transferir sua fosforila para ADP, formando ATP. De fato, esta transferência é uma das maneiras pela qual é produzido ATP na degradação de carboidratos (Capítulo 16). É significativo que o ATP tenha um potencial de transferência de fosforila intermediário entre as moléculas fosforiladas biologicamente importantes (Tabela 15.1). *Esta posição intermediária capacita o ATP a funcionar com eficiência como um carreador de grupo fosforila.*

A quantidade de ATP no músculo é suficiente para manter a atividade contrátil por menos de um segundo. A fosfocreatina nos músculos de vertebrados atua como um reservatório de grupo fosforila de alto potencial que pode ser prontamente transferido para ADP. De fato, utilizamos fosfocreatina para regenerar ATP a partir de ADP sempre que nos exercitamos vigorosamente. Esta reação é catalisada pela *enzima creatinoquinase*.

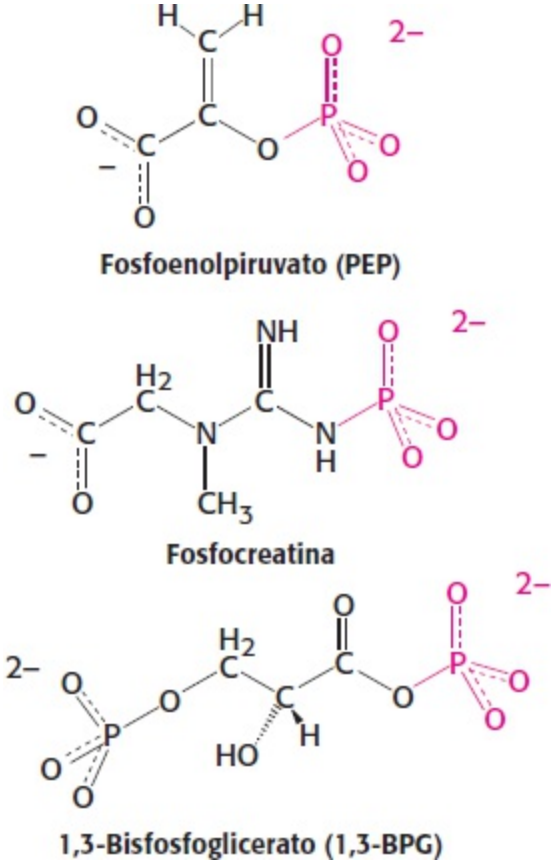


Figura 15.6 Compostos de alto potencial de transferência de fosforila. Estes compostos têm um potencial mais elevado de transferência de gupo fosforila do que o do ATP e podem ser utilizados para fosforilar ADP e formar ATP.

$$\text{Fosfocreatina} + \text{ADP} \overset{\text{Creatinoquinase}}{\rightleftharpoons} \text{ATP} + \text{creatina}$$

Em pH 7, a energia livre padrão da hidrólise da fosfocreatina é de –43,1 kJ mol^{-1} (–10,3 kcal mol^{-1}), comparada com 30,5 kJ mol^{-1} (–7,3 kcal mol^{-1}) do ATP. Por isso, a variação de energia livre padrão para formar ATP a partir de fosfocreatina é de –12,6 kJ mol^{-1} (–3,0 kcal mol^{-1}), o que corresponde a uma constante de equilíbrio de 162.

$$K_{eq} = \frac{[\text{ATP}][\text{creatina}]}{[\text{ADP}][\text{fosfocreatina}]} = 10^{-\Delta G^{\circ\prime}/5{,}69} = 10^{12{,}6/5{,}69} = 162$$

No músculo em repouso, as concentrações típicas destes metabólitos são [ATP] = 4 mM, [ADP] = 0,013 mM e [fosfocreatina] = 25 mM e [creatina] = 13 mM. Por causa de sua abundância e de seu alto potencial de transferência de grupo fosforila em relação ao ATP, a fosfocreatina é um tampão de fosforila muito efetivo. De fato, a fosfocreatina é a principal fonte de grupo fosforila para a regeneração de ATP para um corredor durante os 4 primeiros segundos de uma corrida de 100 metros. Como a fosfocreatina consegue repor as reservas de ATP, ela é utilizada por atletas como suplemento alimentar em esportes que exigem rajadas curtas de intensa atividade Quando acaba a reserva de fosfocreatina, o ATP tem de ser produzido pelo metabolismo (Figura 15.7).

Tabela 15.1 Energia livre padrão da hidrólise de alguns compostos fosforilados.

Composto	kJ mol^{-1}	kcal mol^{-1}
Fosfoenolpiruvato	–61,9	–14,8
1,3-bisfosfoglicerato	–49,4	–11,8
Fosfocreatina	–43,1	–10,3
ATP (para ADP)	–30,5	–7,3
Glicose 1-fosfato	–20,9	–5,0
Pirofosfato	–19,3	–4,6
Glicose 6-fosfato	–13,8	–3,3
Glicerol 3-fosfato	–9,2	–2,2

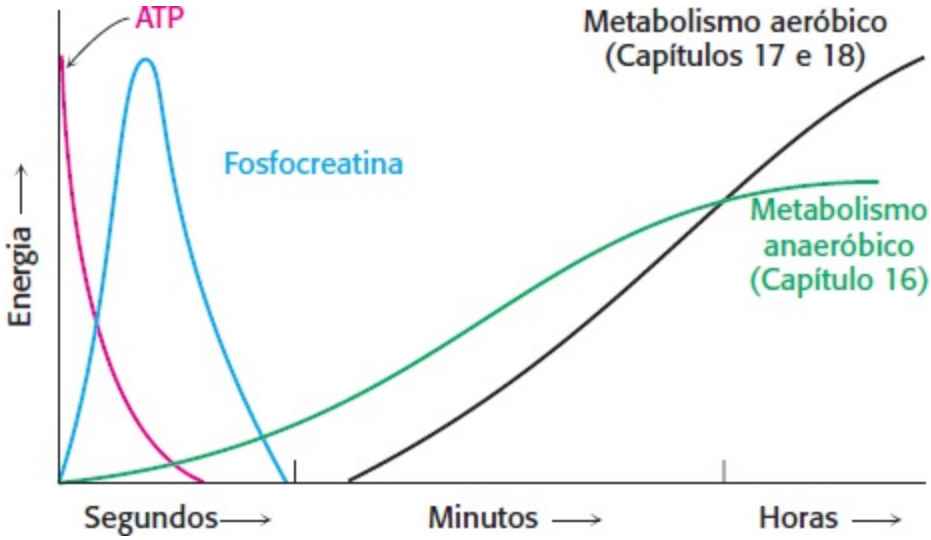


Figura 15.7 Fontes de ATP durante o exercício físico. Nos segundos iniciais, o exercício físico é realizado graças aos compostos de alta transferência de grupo fosforila (ATP e fosfocreatina) preexistentes. A seguir, o ATP tem de ser regenerado pelas vias metabólicas.

15.3 A oxidação de fontes de carbono é um gerador importante de energia celular

O ATP é o principal *doador imediato de energia livre* nos sistemas biológicos, não sendo uma forma de armazenamento a longo prazo de energia livre. Em uma célula típica, uma molécula de ATP é consumida nos 60 segundos seguintes à sua formação. Embora a quantidade total de ATP no organismo seja limitada a aproximadamente 100 g, *a renovação desta pequena quantidade de ATP é muito alta.* Por exemplo, um ser humano em repouso consome cerca de 40 kg de ATP em 24 h. Durante esforço vigoroso, a taxa de utilização de ATP pode chegar a 0,5 kg/ min. Em uma corrida de 2 h, utilizamse 60 kg de ATP. Sem dúvida, é vital ter mecanismos para regenerar o ATP. Movimento, transporte ativo, amplificação de sinal e biossínteses só podem ocorrer se o ATP for continuamente regenerado a partir de ADP (Figura 15.8). A formação de ATP é uma das funções básicas do catabolismo. O carbono nas moléculas energéticas, como glicose e lipídios, é oxidado a CO_2. Os elétrons resultantes são capturados e utilizados para regenerarem ATP a partir de ADP e P_i.

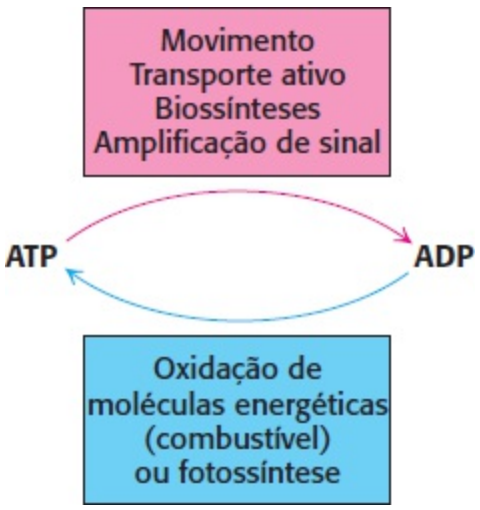
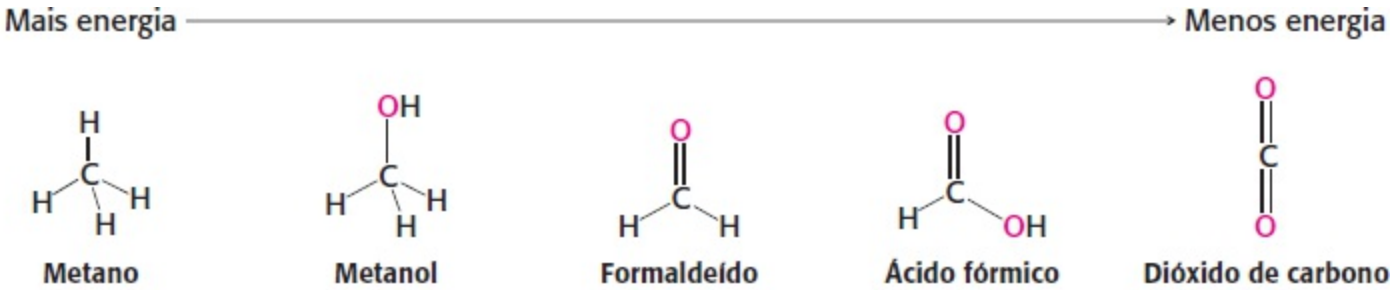


Figura 15.8 Ciclo ATP-ADP. Este ciclo é o modo fundamental de troca de energia nos sistemas biológicos.

Nos organismos aeróbicos, o aceptor final de elétrons na oxidação do carbono é o O_2 e o produto de oxidação é o CO_2. Em consequência, quanto mais reduzido for o carbono no ponto de partida, mais energia livre será liberada pela sua oxidação. A Figura 15.9 exibe $\Delta G^{o'}$ da oxidação de compostos monocarbonados.

Embora moléculas energéticas (combustíveis) sejam mais complexas (Figura 15.10) do que os compostos monocarbonados mostrados na Figura 15.9, quando um composto energético é oxidado, a oxidação ocorre em um carbono de cada vez. A energia da oxidação do carbono é utilizada em alguns casos para produzir um composto com alto poder de transferência de grupo fosforila e em outros casos para produzir um gradiente iônico. Em quaisquer dos casos, o ponto final é a formação de ATP.



	Metano	Metanol	Formaldeído	Ácido fórmico	Dióxido de carbono
$\Delta G'_{oxidação}$ (kJ mol^{-1})	−820	−703	−523	−285	0
$\Delta G'_{oxidação}$ (kcal mol^{-1})	−196	−168	−125	−68	0

Figura 15.9 Energia livre da oxidação de compostos monocarbonados.

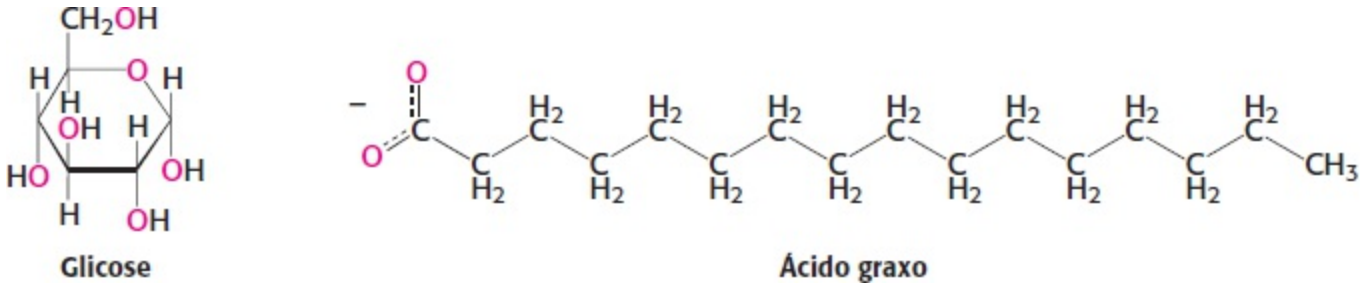
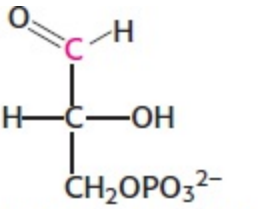


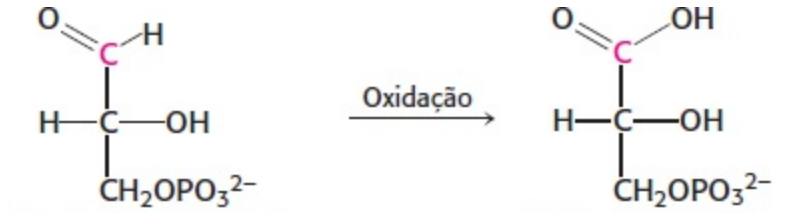
Figura 15.10 Compostos energéticos (combustíveis) proeminentes. Os lipídios são uma fonte de energia mais eficiente que os carboidratos, como a glicose, porque os carbonos nos lipídios são mais reduzidos.

Compostos com alto potencial de transferência de grupo fosforila conseguem acoplar a oxidação de carbono à síntese de ATP

Como a energia liberada na oxidação de um composto carbonado é convertida em ATP? Como exemplo, considere o gliceraldeído 3-fosfato (exibido na margem), que é um metabólito da glicose formado na sua oxidação. O carbono C-1 (exibido em vermelho) está no nível de oxidação de aldeído e não se encontra em seu estado mais oxidado. A oxidação do aldeído a um ácido liberará energia.

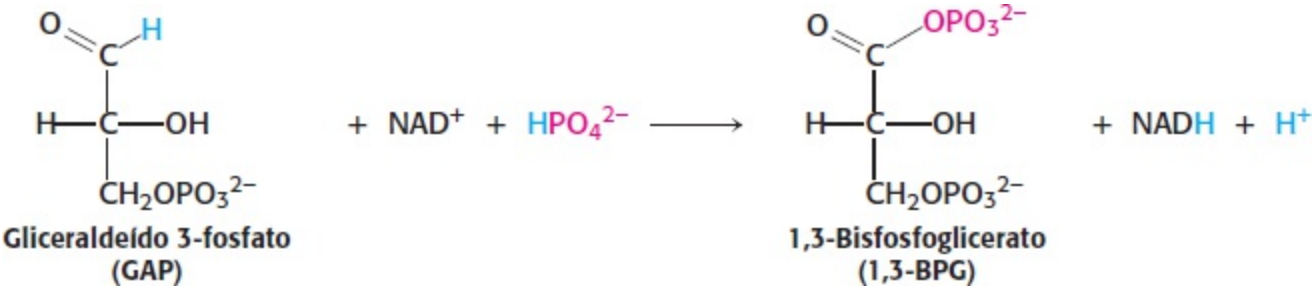


Gliceraldeído 3-fosfato (GAP)



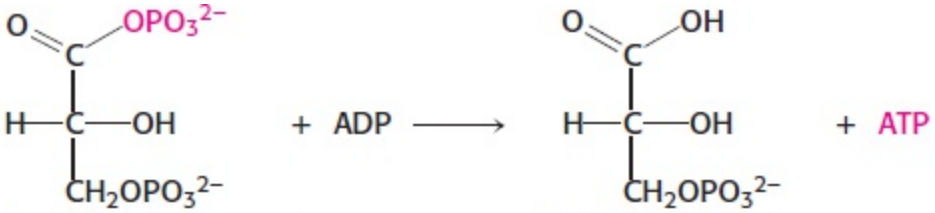
Gliceraldeído 3-fosfato **Ácido 3-fosfoglicérico**

Todavia, a oxidação não ocorre de modo direto. De fato, a oxidação do carbono produz um acilfosfato, o 1,3-bisfosfoglicerato. Os elétrons liberados são capturados pelo NAD^+, que veremos adiante.



Gliceraldeído 3-fosfato (GAP) **1,3-Bisfosfoglicerato (1,3-BPG)**

Por motivos semelhantes aos abordados para o ATP, o 1,3-bisfosfoglicerato tem alto potencial de transferência de grupo fosforila. Portanto, a clivagem de 1,3-bisfosfoglicerato pode ser acoplada à síntese de ATP.



1,3-Bisfosfoglicerato (1,3-BPG) **Ácido 3-fosfoglicérico**

A energia de oxidação é inicialmente retida como um composto de alto potencial de transferência de grupo fosforila e, a seguir, utilizada para formar ATP. A energia de oxidação de um átomo de carbono é transformada em potencial de transferência de grupos fosforila, primeiro como 1,3-bisfosfoglicerato e, finalmente, como ATP. Estudaremos estas reações com detalhes do mecanismo no Capítulo 16.

Gradientes iônicos através de membranas fornecem uma importante forma de energia celular que pode ser acoplada à síntese de ATP

Como descrito no Capítulo 13, potencial eletroquímico é um meio efetivo de armazenar energia livre.

De fato, o potencial eletroquímico dos *gradientes iônicos através de membranas,* produzido por oxidação de moléculas energéticas ou por fotossíntese, acaba impulsionando a síntese da maior parte do ATP nas células. Em geral, os gradientes iônicos são formas versáteis de acoplar reações termodinamicamente desfavoráveis com as favoráveis. De fato, nos animais, os *gradientes de prótons* gerados pela oxidação de compostos energéticos carbonados são responsáveis por mais de 90% da produção de ATP (Figura 15.11). Este processo é denominado *fosforilação oxidativa* (Capítulo 18). A hidrólise do ATP pode ser então utilizada para formar gradientes iônicos de diferentes tipos e funções. Por exemplo, o potencial eletroquímico de um gradiente de Na^+ pode ser usado para bombear Ca^{2+} para fora das células ou transportar nutrientes como carboidratos e aminoácidos para dentro delas.

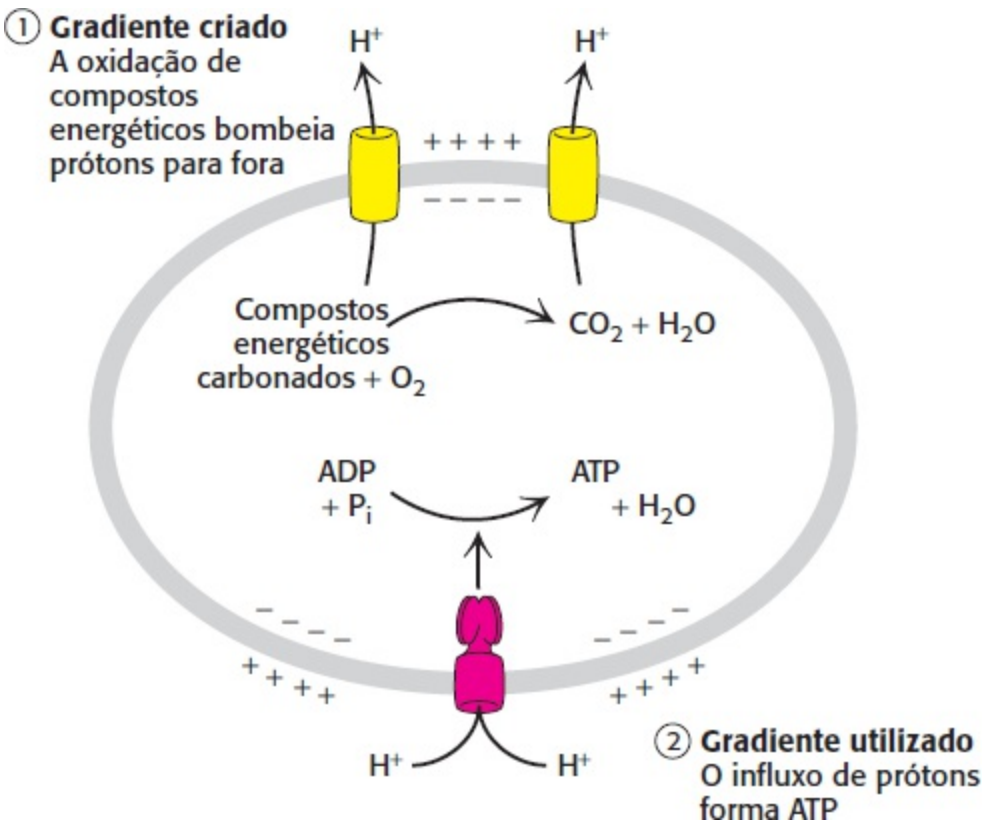


Figura 15.11 Gradiente de prótons. A oxidação de compostos energéticos consegue promover a formação de gradientes de prótons pela ação de bombas de prótons específicas. Estes gradientes de prótons conseguem, por sua vez, impulsionar a síntese de ATP quando os prótons fluem através de uma enzima sintetizadora de ATP.

A energia dos alimentos é extraída em três estágios

Tenhamos agora uma visão global dos processos de conversão de energia nos organismos superiores antes de considerá-los com detalhes nos próximos capítulos. Hans Krebs descreveu três estágios na produção de energia a partir da oxidação de alimentos (Figura 15.12).

No primeiro estágio, as grandes moléculas presentes em alimentos são quebradas em unidades menores. Este processo é a *digestão*. As proteínas são hidrolisadas em seus 20 aminoácidos diferentes; os polissacarídios são hidrolisados a monossacarídios (açúcares simples) como a glicose; e lipídios são hidrolisados a glicerol e ácidos graxos. Os produtos da degradação são, a seguir, absorvidos pelas células intestinais e distribuídos por todo o organismo. Este estágio é estritamente preparatório; nenhuma energia útil é capturada nesta fase.

No segundo estágio estas pequenas moléculas numerosas são degradadas a algumas unidades

simples que são essenciais ao metabolismo. De fato, a maioria delas, carboidratos, ácidos graxos, glicerol e vários aminoácidos, é transformada na acetila da acetil-CoA. É produzido algum ATP neste estágio, mas a quantidade é pequena comparada com a obtida no terceiro estágio.

No terceiro estágio, ATP é produzido pela oxidação completa do grupo acetila da acetil-CoA. O terceiro estágio compreende o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa que são as *vias finais comuns na oxidação de moléculas energéticas.* A acetil-CoA traz grupos acetila para o ciclo do ácido cítrico [também denominado ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), ***t**ricarboxylic **a**cid **c**ycle*) ou ciclo de Krebs], onde são totalmente oxidados a CO_2. Quatro pares de elétrons são transferidos (três para NAD^+ e um para o FAD) para cada grupo acetila que é oxidado. A seguir, um gradiente de prótons é produzido como resultado do fluxo de elétrons a partir das formas reduzidas destes carreadores até o O_2, e este gradiente é utilizado para sintetizar ATP.

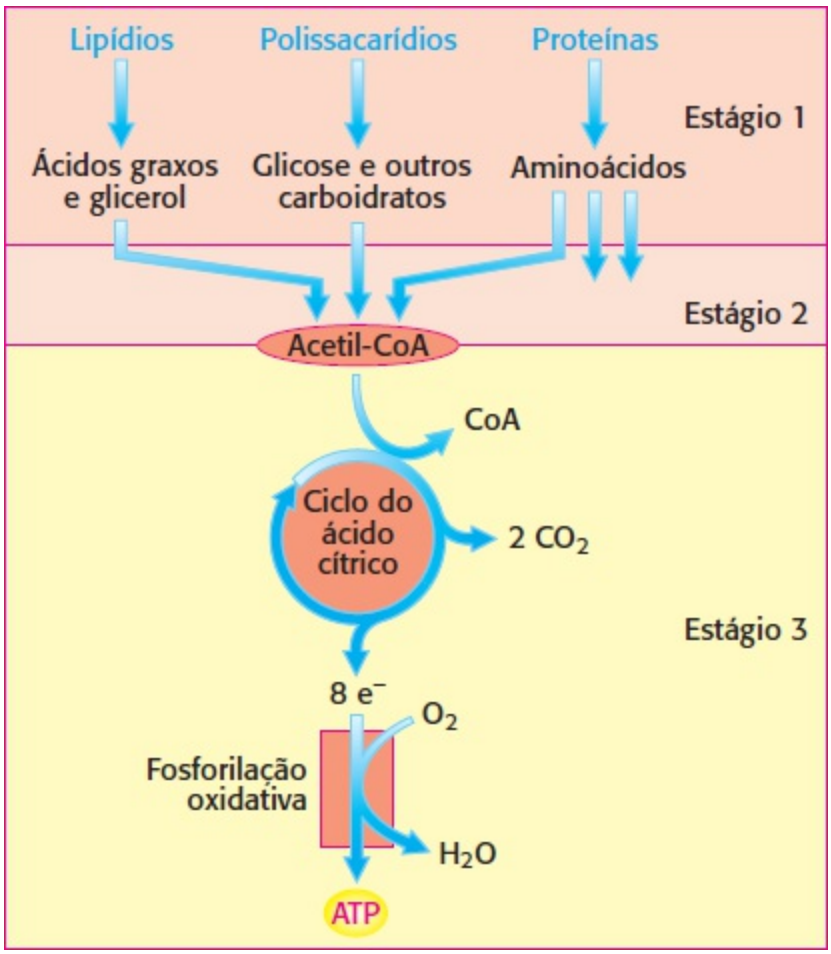


Figura 15.12 Estágios do catabolismo. A extração de energia a partir de compostos energéticos pode ser dividida em três estágios.

15.4 As vias metabólicas contêm muitos padrões (*motifs*) recorrentes

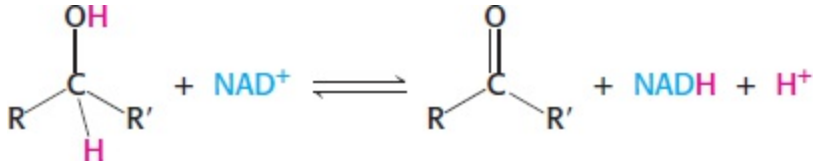
Á primeira vista, o metabolismo gera apreensão devido à quantidade enorme de reagentes e produtos. Contudo, há temas unificadores que ajudam a compreender esta complexidade. Estes padrões têm em comum metabólitos, reações e esquemas de regulação que apresentam uma herança evolutiva comum.

Carreadores ativados exemplificam a natureza modular e econômica do metabolismo

Vimos que a transferência de grupo fosforila pode ser utilizada para impulsionar reações endergônicas, alterar a energia de conformação de uma proteína ou servir como um sinal para alterar a atividade de uma proteína. O doador de grupo fosforila em todas estas reações é o ATP. Em outras palavras, *ATP é um carreador ativado de grupos fosforila, porque a transferência destes a partir do ATP é um processo exergônico.* A utilização de carreadores ativados é um padrão recorrente na bioquímica; muitos deles funcionam como coenzimas:

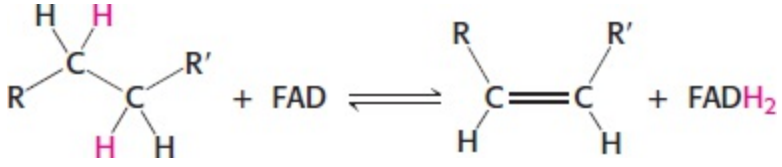
1. *Carreadores ativados de elétrons para axidação de compostos energéticos.* Nos organismos aeróbicos, o aceptor final de elétrons na oxidação de moléculas energéticas é o O_2. Contudo, os elétrons não são transferidos diretamente para O_2. Em vez disso, as moléculas energéticas transferem elétrons para carreadores especiais, que são *nucleotídios piridínicos* ou *flavinas*. As formas reduzidas destes carreadores transferem, então, seus elétrons de alto potencial para o O_2.

Nicotinamida adenina dinucleotídio é um importante carreador de elétrons na oxidação de compostos energéticos (Figura 15.13). A parte reativa do NAD^+ é seu anel de nicotinamida, um derivado piridínico sintetizado a partir da vitamina niacina. *Na oxidação de um substrato, o anel de nicotinamida do NAD^+ aceita um íon hidrogênio e dois elétrons, o que equivale a um íon hidreto* ($H:^-$). A forma reduzida do carreador é denominada *NADH.* Na forma oxidada, o átomo de nitrogênio apresenta carga elétrica positiva, como indicado por NAD^+. NAD^+ é o aceptor de elétrons em muitas reações do tipo



Nesta desidrogenação, um átomo de hidrogênio do substrato é transferido diretamente para o NAD^+, enquanto o outro aparece no solvente como um próton. Ambos os elétrons perdidos pelo substrato são transferidos para o anel de nicotinamida.

O outro carreador importante na oxidação de moléculas energéticas é a coenzima *flavina adenina dinucleotídio* (Figura 15.14). As abreviaturas para a forma oxidada e reduzida deste carreador são FAD e $FADH_2$, respectivamente. FAD é o aceptor de elétrons nas reações do tipo



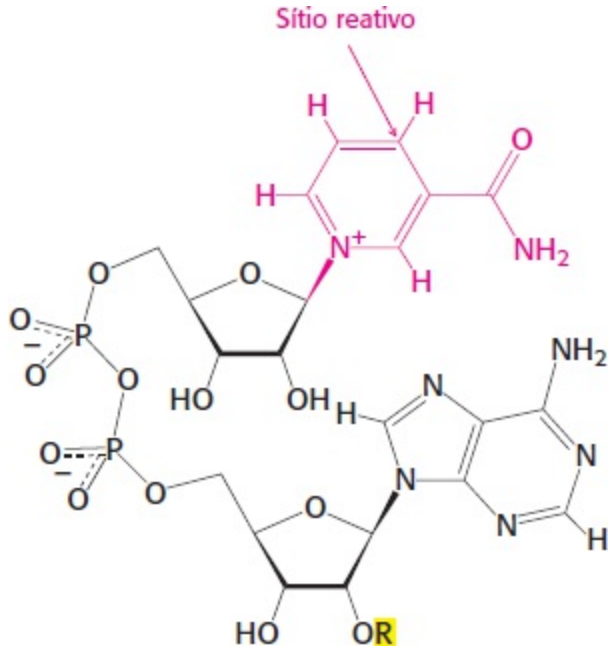


Figura 15.13 Estrutura das formas oxidadas dos carreadores de elétrons derivados da nicotinamida. Nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD^+) e nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato ($NADP^+$) são carreadores proeminentes de elétrons de alta energia. No NAD^+, R = H; no $NADP^+$, R = PO_3^{2-}.

A parte reativa do FAD é seu anel de isoaloxazina, um derivado da vitamina riboflavina (Figura 15.15). FAD, à semelhança do NAD^+, consegue aceitar dois elétrons. Ao fazer isso, FAD, diferente do NAD^+, capta dois prótons. Estes carreadores de elétrons de alto potencial, assim como a flavina mononucleotídio (FMN), um carreador de elétron semelhante ao FAD, porém sem o nucleotídio de adenina, serão estudados mais adiante, no Capítulo 18.

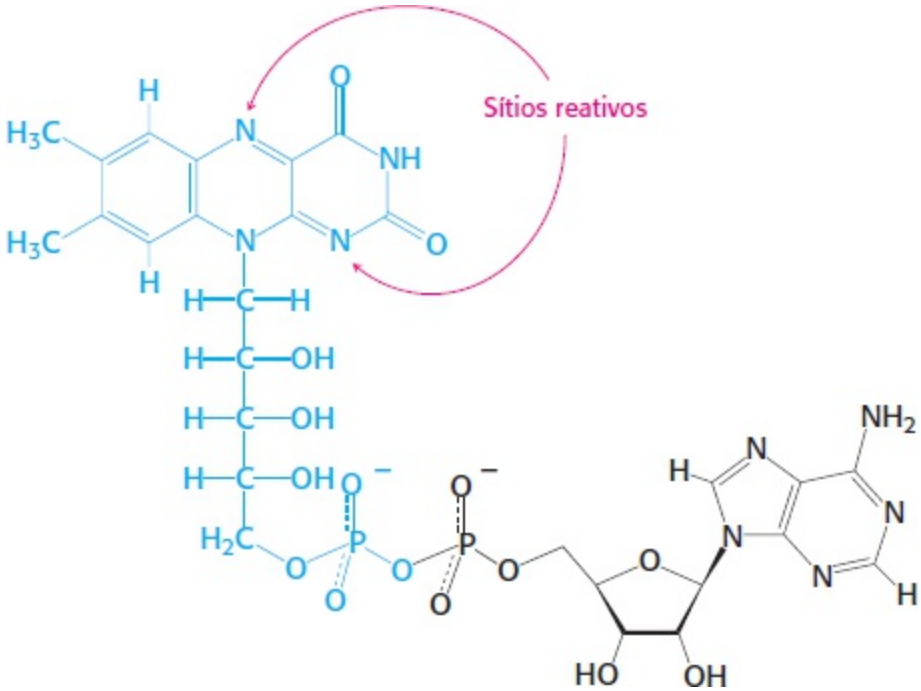


Figura 15.14 Estrutura da forma oxidada da flavina adenina dinucleotídio (FAD). Este carreador de elétrons é constituído por um flavina mononucleotídio (FMN, exibida em azul) e por um AMP (exibido em preto).

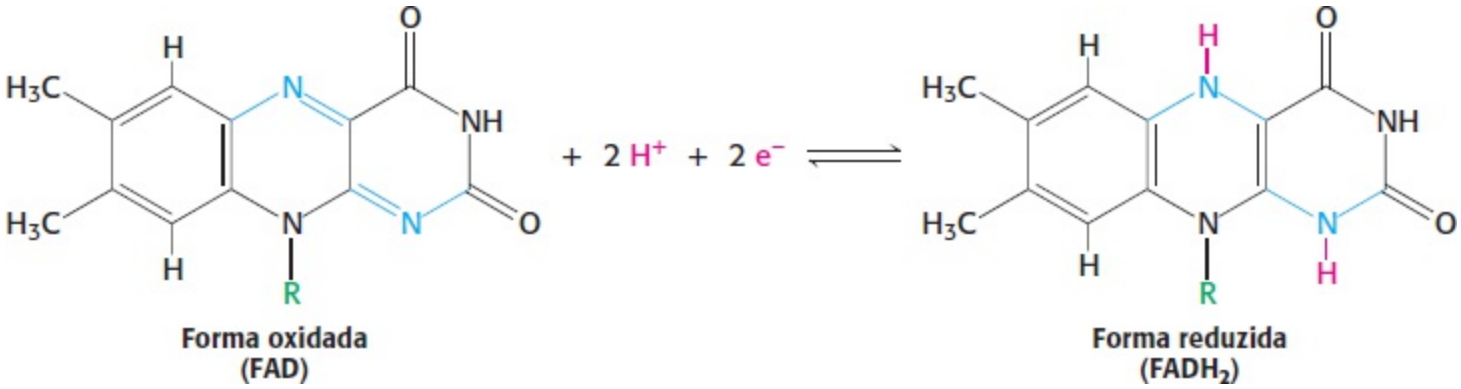
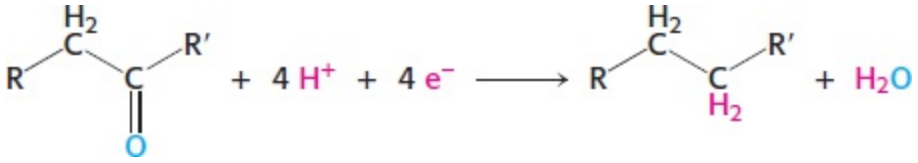


Figura 15.15 Estruturas das partes reativas do FAD e $FADH_2$. Os elétrons e os prótons são carreados pelo anel de isoaloxazina componente de FAD e $FADH_2$.

2. *Um carreador ativado de elétrons para a biossíntese redutora.* Elétrons de alto potencial são necessários para a maioria das biossínteses porque os precursores são mais oxidados que os produtos. Por isso, é necessário um poder redutor além de ATP. Por exemplo, na biossíntese de ácidos graxos, o grupo cetona de uma unidade de dois carbonos adicionada é reduzido a um grupo metila em várias etapas. Esta sequência de reações exige o aporte de quatro elétrons.



O doador de elétrons na maioria das biossínteses redutoras é o NADPH, a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato ($NADPH^+$; ver Figura 15.13). O NADPH difere do NADH pelo fato de o grupo 2 -hidroxila da porção adenosina estar esterificado com fosfato. NADPH carreia elétrons do mesmo modo que o NADH. Contudo, *NADPH é utilizado quase que exclusivamente para biossínteses redutoras, ao passo que o NADH é utilizado basicamente para a produção de ATP.* O grupo fosforila extra do NADPH é que permite que enzimas distinguam elétrons de alto potencial para serem utilizados no anabolismo daqueles a serem empregados no catabolismo.

3. *Um carreador ativado de fragmentos de dois carbonos.* A coenzima A, outra molécula central do metabolismo, é um carreador de grupo acila derivado da vitamina pantotenato (Figura 15.16). Os grupos acila são importantes tanto no catabolismo (p.ex., na oxidação de ácidos graxos), como no anabolismo (p.ex., na síntese de lipídios de membrana). O grupo sulfidrila terminal da CoA é o sítio reativo. Os grupos acila unem-se à CoA por ligações tioéster. O derivado resultante é denominado *acil-CoA.* Um grupo acila frequentemente ligado à CoA é a unidade acetila; este derivado é chamado de *acetil-CoA.* $\Delta G^{o'}$ para a hidrólise da acetil-CoA tem um grande valor negativo:

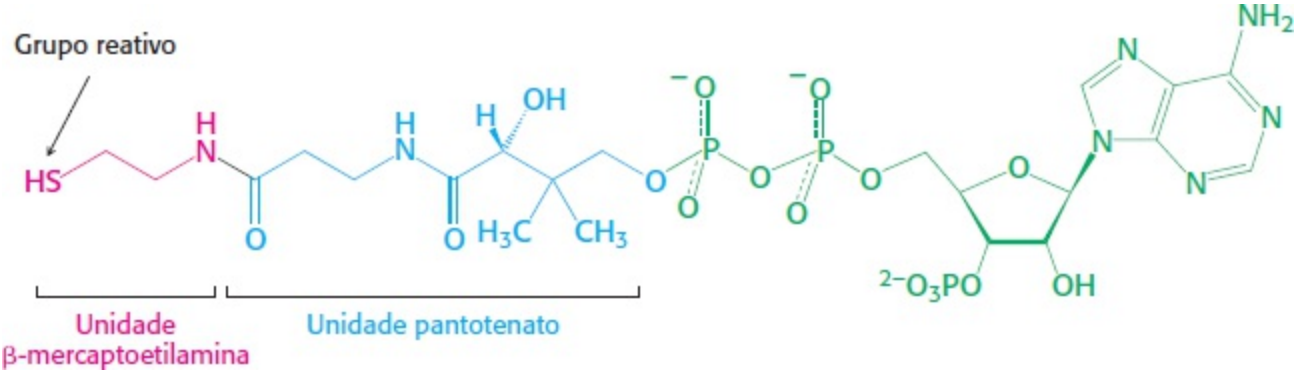
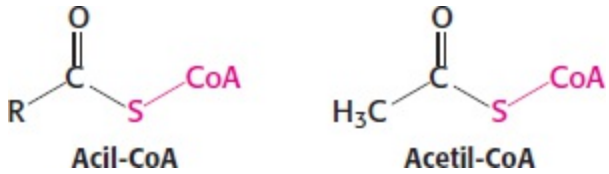


Figura 15.16 Estrutura da coenzima A (CoA-SH).

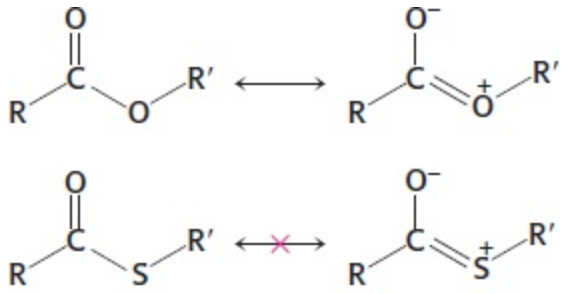
$$\text{Acetil-CoA} + H_2O \rightleftharpoons \text{acetao} + \text{CoA} + H^+$$

$$\Delta G^{o\prime} = -31{,}4 \text{ kJ mol}^{-1} \ (-7{,}5 \text{ kcal mol}^{-1})$$



A hidrólise de um tioéster é termodinamicamente mais favorável do que a de um éster de oxigênio porque os elétrons da ligação C═O não conseguem formar estruturas de ressonância com a ligação C—S que sejam tão estáveis como as que conseguem formar com a ligação C—O. Em consequência, *acetil-CoA tem alto potencial de transferência de grupos acetila, porque esta transferência é exergônica.* Acetil-CoA carreia um grupo acetila ativado, como o ATP carreia um grupo fosforila ativado.

A utilização de carreadores ativados ilustra dois aspectos importantes do metabolismo. Primeiro, NADH, NADPH e $FADH_2$ reagem lentamente com O_2 na ausência de um catalisador. Da mesma forma, ATP e acetil-CoA são hidrolisados lentamente (em muitas horas ou mesmo dias) na ausência de um catalisador. Estas moléculas são cineticamente bastante estáveis em face a uma grande força termodinâmica que impulsiona a reação com o O_2 (em relação aos carreadores de elétrons) e com a H_2O (em relação a ATP e acetil-CoA). *A estabilidade cinética destas moléculas na ausência de catalisadores específicos é essencial para a sua função biológica, porque permite que as enzimas controlem o fluxo de energia livre e o poder redutor.*



Ésteres de oxigênio são estabilizados por estruturas de ressonância que não estão disponíveis para tioésteres.

Segundo, *a maioria das trocas de grupos ativados no metabolismo é realizada por um conjunto muito pequeno de carreadores* (Tabela 15.2). A existência de um conjunto repetitivo de carreadores

ativados em todos os organismos é um dos padrões unificadores da bioquímica, e ilustra o aspecto modular do metabolismo. Um pequeno conjunto de moléculas executa uma ampla gama de tarefas. É fácil compreender o metabolismo por causa da economia e elegância de seu projeto subjacente.

Tabela 15.2 Alguns carreadores ativados do metabolismo.

Molécula carreadora na forma ativada	Grupo carreado	Vitamina precursora
ATP	Fosforila	–
NADH e NADPH	Elétrons	Nicotinato (niacina)
$FADH_2$	Elétrons	Riboflavina (vitamina B_2)
$FMNH_2$	Elétrons	Riboflavina (vitamina B_2)
Coenzima A	Acila	Pantotenato
Lipoamida	Acila	–
Tiamina pirofosfato	Aldeído	Tiamina (vitamina B_1)
Biotina	CO_2	Biotina
Tetraidrofolato	Unidades com um carbono	Folato
S-adenosilmetionina	Metila	–
Uridina difosfato glicose	Glicose	–
Citidina difosfato diacilglicerol	Fosfatidato	–
Nucleosídio trifosfatos	Nucleotídios	–

Nota: Muitos dos carreadores ativados são coenzimas derivadas de vitaminas hidrossolúveis.

Tabela 15.3 As vitaminas do complexo B.

Vitamina	Coenzima	Reação típica	Consequências da deficiência
Tiamina (B_1)	Tiamina pirofosfato	Transferência de aldeídos	Beribéri (perda de peso, problemas cardíacos, disfunção neurológica)
Riboflavina (B_2)	Flavina adenina dinucleotídio (FAD)	Oxirredução	Queilose e estomatite angular (lesões orais), dermatite
Piridoxina (B_6)	Piridoxal fosfato	Transferência de grupo de aminoácidos ou para aminoácidos	Depressão, confusão, crises convulsivas
Ácido nicotínico (niacina)	Nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD+)	Oxirredução	Pelagra (dermatite, depressão, diarreia)
Ácido pantotênico	Coenzima A	Transferências de acilas	Hipertensão arterial

Biotina	Aductos biotina-lisina (biocitina)	Carboxilação dependente de ATP e transferência de grupos carboxila dependentes	Erupção cutânea em torno das sobrancelhas, dor muscular, fadiga (rara)
Ácido fólico	Tetraidrofolato	Transferência de compostos monocarbonados; síntese de timina	Anemia, defeitos do desenvolvimento do tubo neural
B_{12}	5′-desoxiadenosil cobalamina	Transferência de grupos metila; rearranjos intramoleculares	Anemia, anemia perniciosa, acidose metilmalônica

Muitos carreadores ativados derivam de vitaminas

Quase todos os carreadores ativados que atuam como coenzimas derivam de *vitaminas*. Vitaminas são moléculas orgânicas necessárias em quantidades pequenas na alimentação de alguns animais superiores. A Tabela 15.3 lista as vitaminas que atuam como coenzimas, e a Figura 15.17 exibe as estruturas de algumas. Esta série de vitaminas é conhecida como vitaminas do complexo B. Observe que, em todos os casos, a vitamina tem de ser modificada antes de exercer sua função. Já comentamos as funções da niacina, da riboflavina e do pantotenato. Veremos estas três e as outras vitaminas do complexo B muitas vezes no nosso estudo da bioquímica.

As vitaminas desempenham as mesmas funções em quase todas as formas de vida, mas os animais superiores perderam a capacidade de sintetizá-las no decorrer da evolução. Por exemplo, enquanto *E. coli* consegue crescer com glicose e sais orgânicos, os seres humanos necessitam de pelo menos 12 vitaminas na alimentação. As vias de biossíntese de vitaminas podem ser complexas; assim é biologicamente mais eficiente ingeri-las do que sintetizar as enzimas necessárias para elaborá-las a partir de moléculas simples. Esta eficiência implica a dependência de outros organismos para obter substâncias essenciais à vida. De fato, deficiências de vitaminas podem levar ao aparecimento de doenças em todos os organismos que necessitam destas moléculas (Tabelas 15.3 e 15.4).

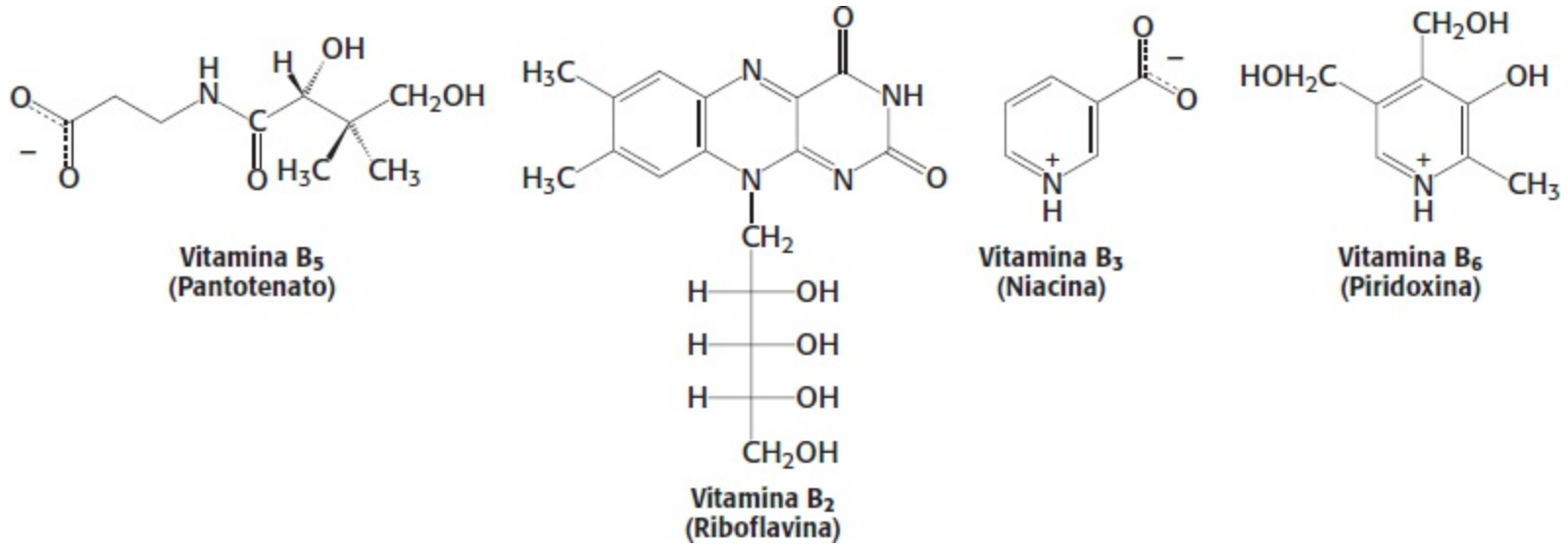


Figura 15.17 Estruturas de algumas das vitaminas do complexo B.

Tabela 15.4 Vitaminas não coenzímicas.

Vitamina	Função	Deficiência
A	Na visão, no crescimento, na reprodução	Cegueira noturna, lesões de córnea, lesões das vias respiratórias e gastrintestinais
C (ácido ascórbico)	Antioxidante	Escorbuto (tumefação e sangramento gengivais, hemorragia subdérmica)
D	Regulação do metabolismo do cálcio e do fosfato	Raquitismo (crianças), deformações esqueléticas, atraso de crescimento Osteomalacia (adultos): amolecimento generalizado dos ossos com consequentes deformações
E	Antioxidante	Inibição da produção de espermatozoides; lesões nos músculos e nervos (raro)
K	Coagulação sanguínea	Hemorragia subdérmica

Nem todas as vitaminas atuam como coenzimas. As vitaminas designadas como A, C, D, E e K (Figura 15.8 e Tabela 15.4) desempenham várias funções. A vitamina A (retinol) é precursora do retinal, o grupo fotossensível na rodopsina e em outros pigmentos visuais (Seção 32.3), e do ácido retinoico, uma importante molécula de sinalização. A deficiência desta vitamina resulta em cegueira noturna. Além disso, animais jovens necessitam de vitamina A para o crescimento. Vitamina C (ascorbato) atua como antioxidante. A deficiência de vitamina C pode levar ao escorbuto, uma doença devida à malformação do colágeno e caracterizada por lesões de pele e fragilidade dos vasos sanguíneos (Seção 27.6). Um metabólito de vitamina D é um hormônio que regula o metabolismo do cálcio e do fósforo. A deficiência desta vitamina prejudica a formação óssea em animais em crescimento. A infertilidade em ratos é uma consequência da deficiência de vitamina E (α-tocoferol). Esta vitamina reage com formas reativas de oxigênio, como os radicais hidroxila, inativando-os antes que eles possam oxidar os lipídios insaturados de membranas, lesando as estruturas celulares. A vitamina K é necessária à coagulação normal do sangue (Seção 10.4).

Reações-chave repetem-se por todo o metabolismo

Assim como há uma "economia do planejamento" na utilização de carreadores ativados, há também uma "economia" no desenho das reações bioquímicas. As milhares de reações metabólicas, inicialmente desconcertantes por sua variedade, podem ser subdivididas em apenas seis tipos (Tabela 15.5). As reações específicas de cada tipo aparecem repetidamente, reduzindo em muito o número de reações que o estudante precisa aprender.

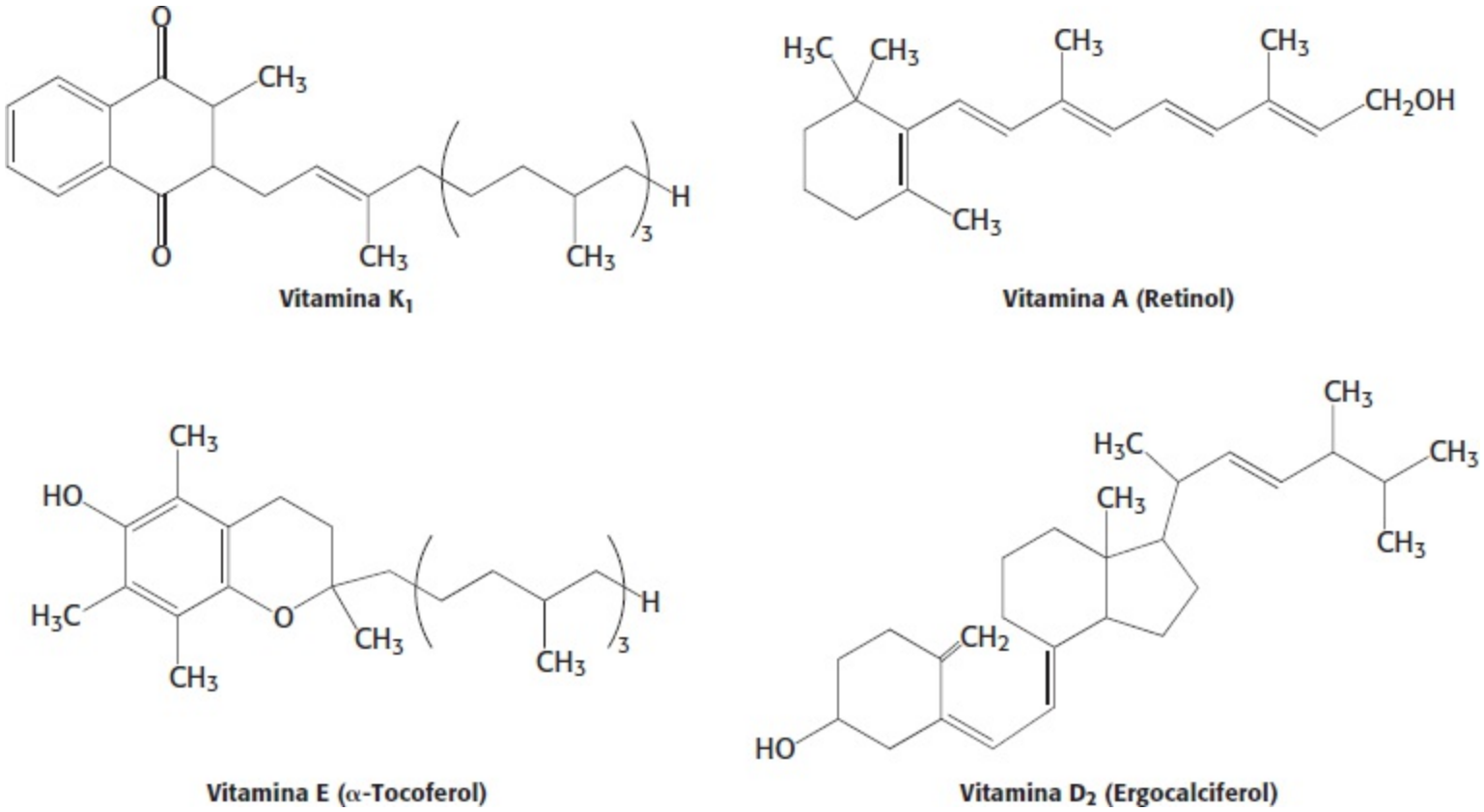
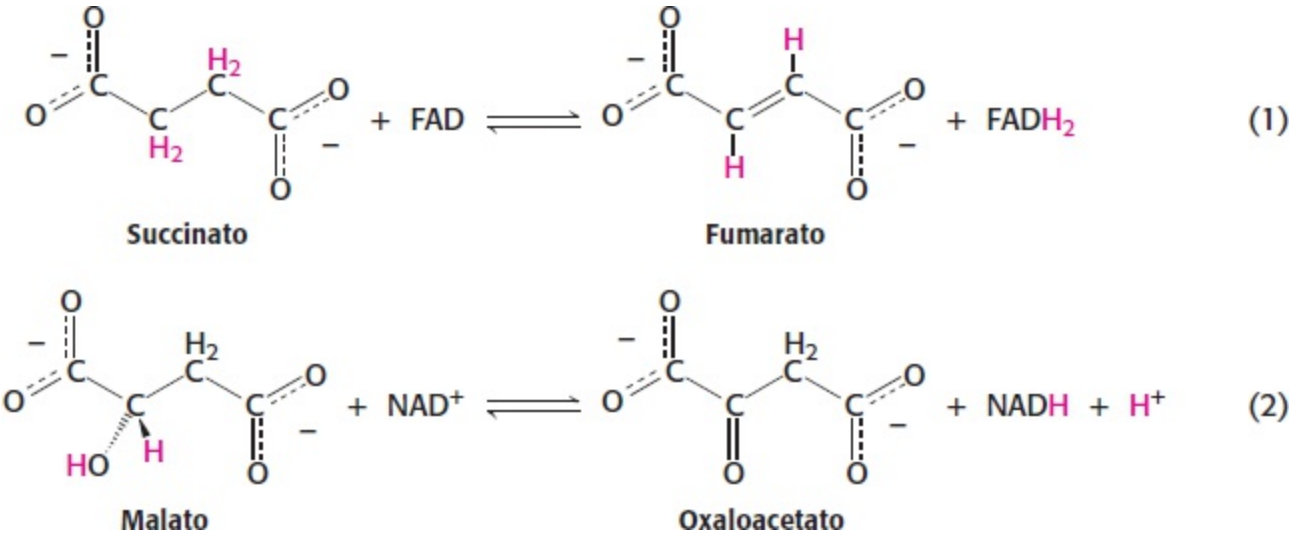


Figura 15.18 Estruturas de algumas vitaminas que não atuam como coenzimas.

Tabela 15.5 Tipos de reações químicas do metabolismo.

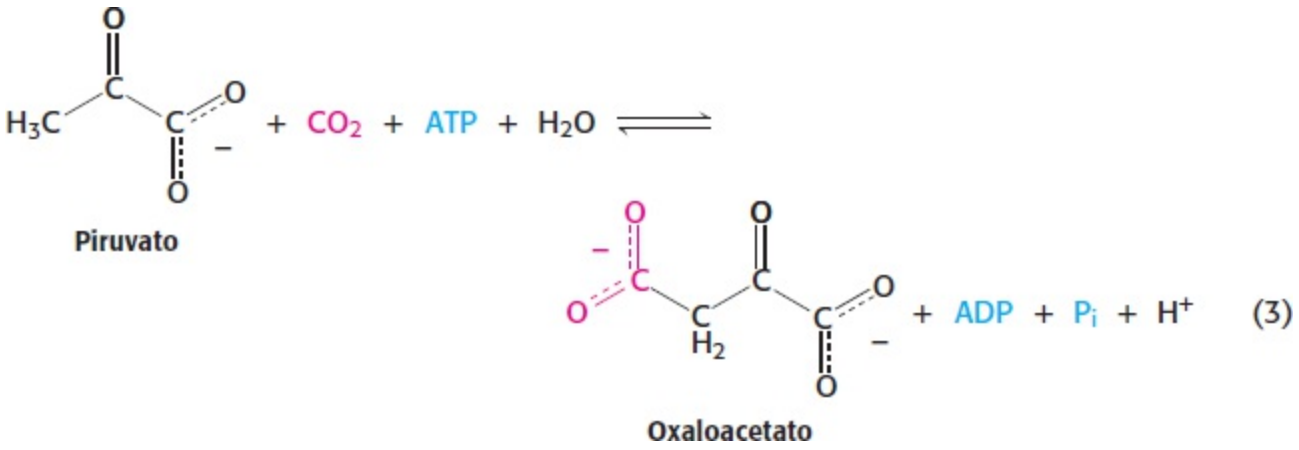
Tipo de reação	Descrição
Oxirredução	Transferência de elétrons
Ligação que exige clivagem de ATP	Formação de ligações covalentes (p.ex., ligações carbono-carbono)
Isomerização	Rearranjo de átomos para formar isômeros
Transferência de grupo	Transferência de um grupo funcional de uma molécula para outra
Hidrólise	Clivagem de ligações pelo acréscimo de água
Acréscimo ou remoção de grupos funcionais	Acréscimo de grupos funcionais a ligações duplas ou sua remoção formando duplas ligações

1. *Reações de* oxirredução são componentes essenciais de muitas vias. A energia utilizável geralmente provém da oxidação de compostos de carbono. Considere as duas reações seguintes:



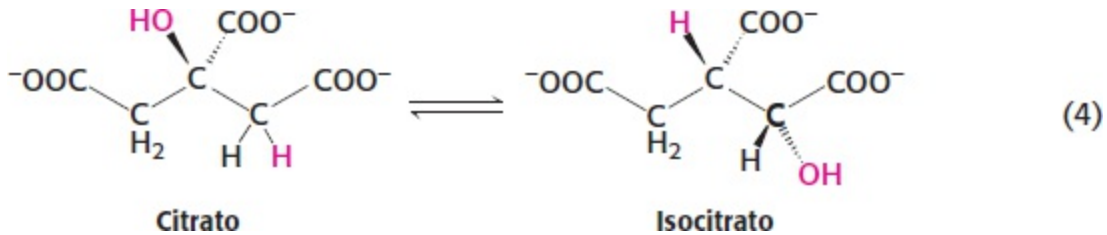
Essas duas reações de oxirredução fazem parte do ciclo do ácido cítrico (Capítulo 17), que oxida completamente o fragmento ativado de dois carbonos da acetil-CoA a duas moléculas de CO_2. Na reação 1, o $FADH_2$ carreia elétrons, ao passo que na reação 2, os elétrons são carreados pelo NADH.

2. *Reações de ligação* formam ligações pela utilização da energia livre da clivagem do ATP. A reação 3 ilustra a formação de uma ligação carbono-carbono dependente de ATP, necessária para combinar pequenas moléculas e formar moléculas maiores. O oxaloacetato é formado a partir de piruvato e CO_2.



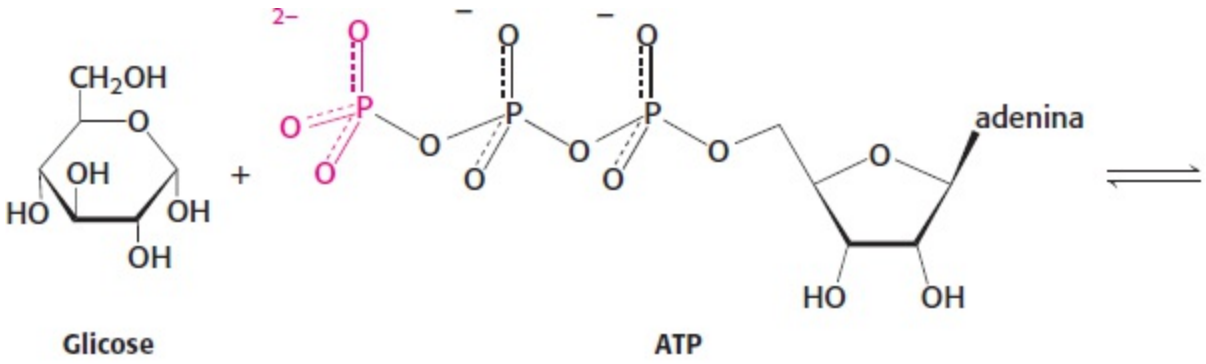
O oxaloacetato pode ser utilizado no ciclo do ácido cítrico ou convertido em aminoácidos, como o ácido aspártico.

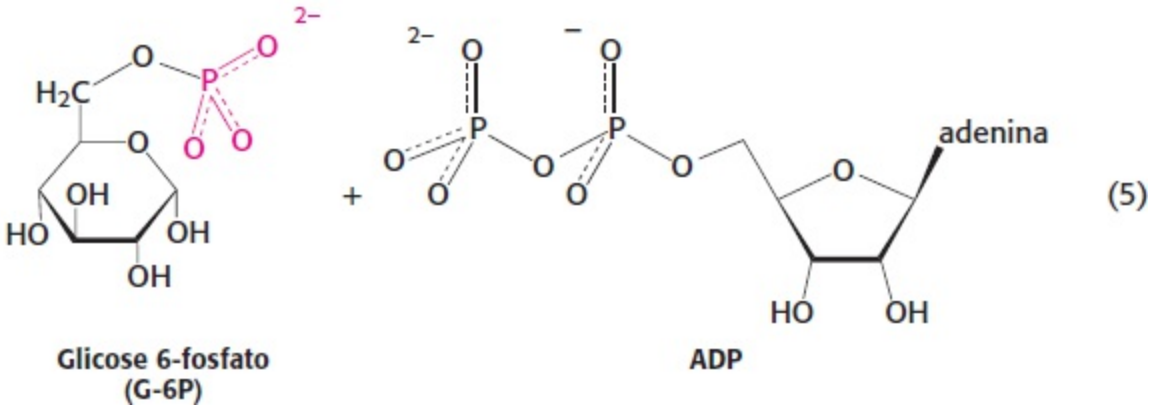
3. *Reações de isomerização* rearranjam átomos específicos em uma molécula. Muitas vezes preparam uma molécula para as reações seguintes, como as reações de oxirredução descritas no item 1.



A reação 4 é, mais uma vez, um componente do ciclo do ácido cítrico. Esta isomerização prepara em seguida a molécula para oxidação e descarboxilação, movendo a hidroxila do citrato de uma posição terciária para uma secundária.

4. *Reações de transferência* de grupo desempenham vários papéis. A reação 5 representa uma de tais reações. Um grupo fosforila é transferido de um carreador de fosforila ativado, o ATP, para a glicose, a etapa inicial da glicólise, uma via importante para extrair energia da glicose (Capítulo 16). Esta reação mantém a glicose dentro da célula, de modo que possa, em seguida, ser catabolizada.

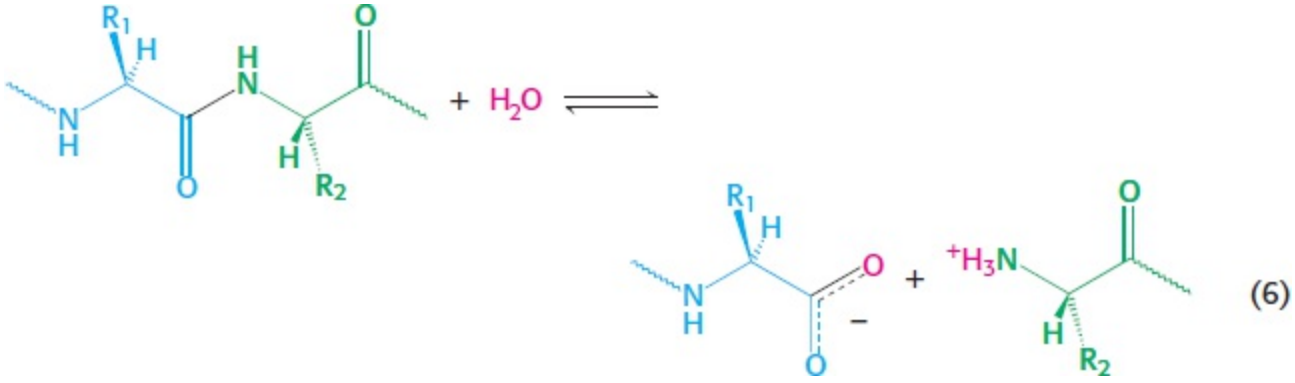




(5)

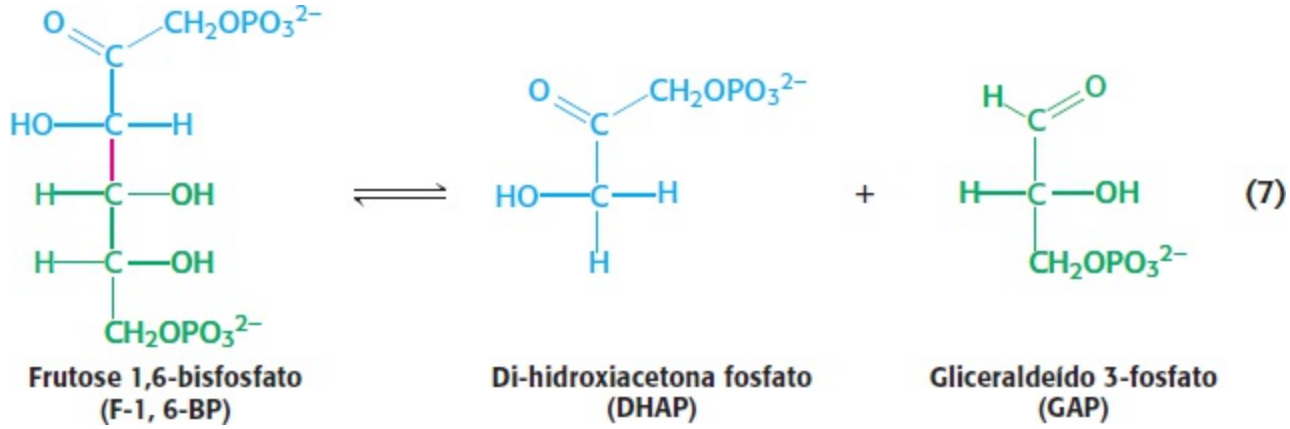
Vimos anteriormente que as reações de transferência de grupos são utilizadas para sintetizar ATP. Vimos também exemplos de sua utilização em vias sinalizadoras (Capítulo 14).

5. *Reações hidrolíticas* clivam ligações pela adição de água. A hidrólise é um mecanismo comumente empregado para clivar grandes moléculas, seja para facilitar seu metabolismo posterior ou para reutilizar alguns componentes para fins de biossíntese. As proteínas são digeridas por clivagens hidrolíticas (Capítulos 9 e 10). A reação 6 ilustra a hidrólise de um peptídio para dar origem a dois peptídios menores.



(6)

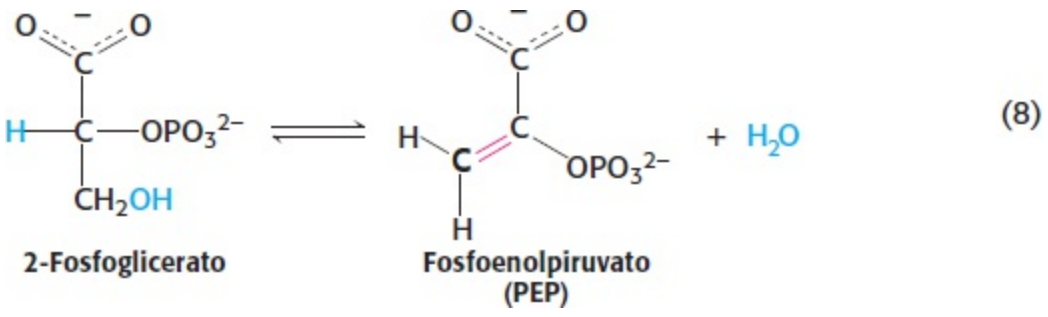
6. *Grupos funcionais podem ser adicionados às duplas ligações para formarem ligações simples ou removidos de ligações simples para formarem ligações duplas.* As enzimas que catalisam estes tipos de reações são classificadas como *liases*. Um exemplo importante, ilustrado na reação 7, é a conversão da molécula de seis carbonos, frutose 1,6-bisfosfato, em dois fragmentos de três carbonos: di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato.



Frutose 1,6-bisfosfato (F-1, 6-BP) | **Di-hidroxiacetona fosfato (DHAP)** | **Gliceraldeído 3-fosfato (GAP)**

(7)

Esta reação é uma etapa crítica da glicólise (Capítulo 16). Desidratações para formar ligações duplas, como a formação de fosfoenolpiruvato (ver Tabela 15.1) a partir de 2-fosfoglicerato (reação 8) são importantes reações deste tipo.



2-Fosfoglicerato | **Fosfoenolpiruvato (PEP)**

(8)

A desidratação dá início à próxima etapa da via, uma transferência de grupo, que utiliza o alto potencial de transferência de grupo fosforila do produto PEP para formar ATP a partir de ADP.

Estes seis tipos de reações fundamentais são a base do metabolismo. Relembre que todos os seis tipos podem ser bidirecionais, dependendo da energia livre padrão para a reação específica e das concentrações intracelulares de reagentes e produtos. Um modo efetivo de aprendizado é buscar as características em comum das diversas vias metabólicas que serão estudadas. Existe uma lógica química que, quando exposta, torna a complexidade da química dos organismos vivos mais maleável, revelando a sua elegância.

Os processos metabólicos são regulados por três modos principais

É evidente que a rede complexa que constitui o metabolismo tem de ser rigorosamente regulada. Ao mesmo tempo, o controle metabólico precisa ser flexível, para ajustar a atividade metabólica aos ambientes externos constantemente mutáveis das células. O metabolismo é regulado pelo controle da (1) *quantidade de enzimas*, (2) *atividade catalítica e* (3) *acessibilidade dos substratos*.

Controle da quantidade de enzimas. A quantidade de uma dada enzima depende da sua velocidade de síntese e de degradação. O nível de muitas enzimas é ajustado principalmente pela alteração da *taxa de transcrição de* genes que as codificam (Capítulos 29 e 31). Por exemplo, na bactéria *E. coli*, a lactose induz, em questão de minutos, um aumento de mais de 50 vezes a velocidade de síntese da β-galactosidase, uma enzima necessária à degradação deste dissacarídio.

Controle da atividade catalítica. A atividade catalítica das enzimas é controlada de vários modos. O *controle alostérico reversível* é especialmente importante. Por exemplo, a primeira reação de muitas vias biossintéticas é alostericamente inibida pelo produto final da via. A inibição da enzima aspartato transcarbamoilase pela citidina trifosfato (Seção 10.1) é um exemplo bem entendido de inibição por retroalimentação (*feedback inhibition)*. Este tipo de controle pode ser quase instantâneo. Outro mecanismo repetitivo é a *modificação covalente reversível*. Por exemplo, a enzima glicogênio fosforilase, que catalisa a degradação do glicogênio, uma forma de armazenamento de carboidrato, é ativada pela fosforilação de um determinado resíduo de serina quando há escassez de glicose (Seção 21.1).

Hormônios coordenam as relações metabólicas entre diferentes tecidos, muitas vezes por meio da regulação da modificação reversível de enzimaschave. Por exemplo, nos músculos, o hormônio epinefrina deflagra uma cascata de transdução de sinal, o que resulta na fosforilação e ativação de enzimas importantes que levam à rápida degradação do glicogênio em glicose, que é a seguir utilizada para fornecer ATP para a contração muscular. Como descrito no Capítulo 14, muitos hormônios atuam por meio de mensageiros intracelulares, como o AMP cíclico e o íon cálcio, que coordenam as atividades de muitas proteínas-alvo.

Muitas reações metabólicas são controladas pelo *estado energético* da célula. Um indicador do estado energético é a *carga energética*, proporcional à fração molar de ATP mais metade da fração molar de ADP, visto que o ATP contém duas ligações anidrido, enquanto o ADP contém uma. Portanto, a carga energética é definida como

$$\text{Carga energética} = \frac{[\text{ATP}] + \frac{1}{2}[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

A carga energética pode ter um valor que varia de 0 (tudo AMP) a 1 (tudo ATP). Daniel Atkinson mostrou que *as vias produtoras de ATP (catabólicas) são inibidas por carga energética alta, enquanto as vias que utilizam ATP (anabólicas) são estimuladas por carga energética alta.* Nos gráficos das velocidades das reações de tais vias *versus* a carga energética, as curvas são mais acentuadas, próximo a uma carga energética de 0,9, onde geralmente ocorre a interseção entre elas (Figura 15.19). É evidente que o controle destas vias evoluiu para manter a carga energética dentro de limites bem estreitos. Em outras palavras, *a carga energética, do mesmo modo que o pH da*

célula, é tamponada. A carga energética da maioria das células varia de 0,80 a 0,95. Um indicador alternativo do estado energético é o *potencial de fosforilação*, definido como

$$\text{Potencial de fosforilação} = \frac{[ATP]}{[ADP] + [P_i]}$$

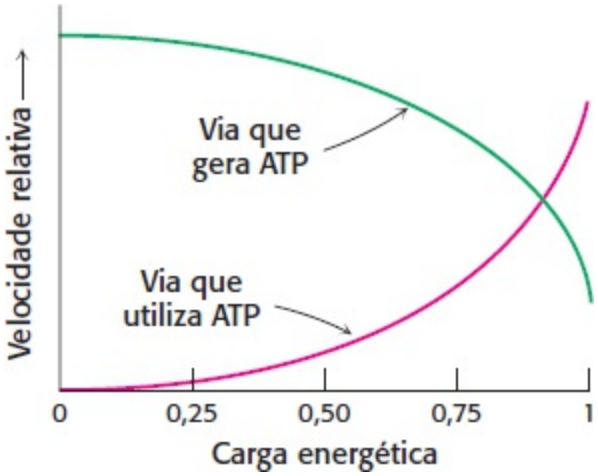


Figura 15.19 A carga energética regula o metabolismo. Concentrações altas de ATP inibem as velocidades relativas de uma via típica de geração de ATP (catabólica) e estimulam uma via típica que utiliza ATP (anabólica).

O potencial de fosforilação, em contraste com a carga energética, depende da concentração de P_i e está relacionado diretamente com a reserva de energia livre disponível a partir do ATP.

Controle da acessibilidade de substratos. Nos eucariotos, a regulação e a flexibilidade metabólica são intensificadas pela compartimentalização. Por exemplo, a oxidação de ácidos graxos ocorre nas mitocôndrias, enquanto a síntese de ácidos graxos ocorre no citoplasma. *A compartimentalização segrega reações opostas.*

O controle do *fluxo de substratos* é outro meio de regular o metabolismo. A degradação da glicose só pode ocorrer em muitas células se houver insulina para promover a entrada da glicose nas células. A transferência de substratos de um compartimento celular para outro (p.ex., do citoplasma para as mitocôndrias) pode funcionar como um ponto de controle.

Aspectos do metabolismo podem ter evoluído de um mundo de RNA

Como evoluíram as vias complexas que constituem o metabolismo? Atualmente se acredita que o RNA era uma biomolécula primordial e que, em um mundo primordial, ele atuava tanto como um catalisador como uma molécula de armazenamento de informação.

Por que carreadores ativados, como ATP, NADH, $FADH_2$ e coenzima A, contêm unidades de adenosina difosfato (Figura 15.20)? Uma explicação possível é que estas moléculas evoluíram a partir de catalisadores primordiais compostos de RNA. Unidades não RNA (p.ex., o anel de isoaloxazina) teriam sido recrutadas para funcionar como carreadores eficientes de elétrons ativados e de unidades químicas, uma função não prontamente executada pelo próprio RNA. Podemos imaginar o anel de adenina do $FADH_2$ ligando-se a uma unidade de uracila em um nicho de uma enzima composta de RNA (ribozima) por pareamento de bases, enquanto o anel de isoaloxazina se projeta e atua como carreador de elétrons. Quando as proteínas mais versáteis substituíram o RNA

como principais catalisadores, as coenzimas ribonucleotídicas permaneceram essencialmente imutáveis porque já eram bem adaptadas às suas funções metabólicas. A unidade de nicotinamida do NADH, por exemplo, consegue prontamente transferir elétrons independentemente da interação da unidade de adenina com uma base em uma ribozima ou com resíduos de aminoácido em uma enzima proteica. Com o advento das enzimas proteicas, estas importantes coenzimas evoluíram para moléculas livres sem a perda do vestígio da adenosina difosfato, vestígio do seu mundo de RNA ancestral. O fato de as moléculas e os padrões do metabolismo serem comuns a todas as formas de vida corrobora uma origem comum e a retenção de módulos funcionantes por bilhões de anos de evolução. Nosso entendimento do metabolismo, como o de outros processos biológicos enriquece-se pela pesquisa de como surgiram estes padrões de reações tão bem integrados.

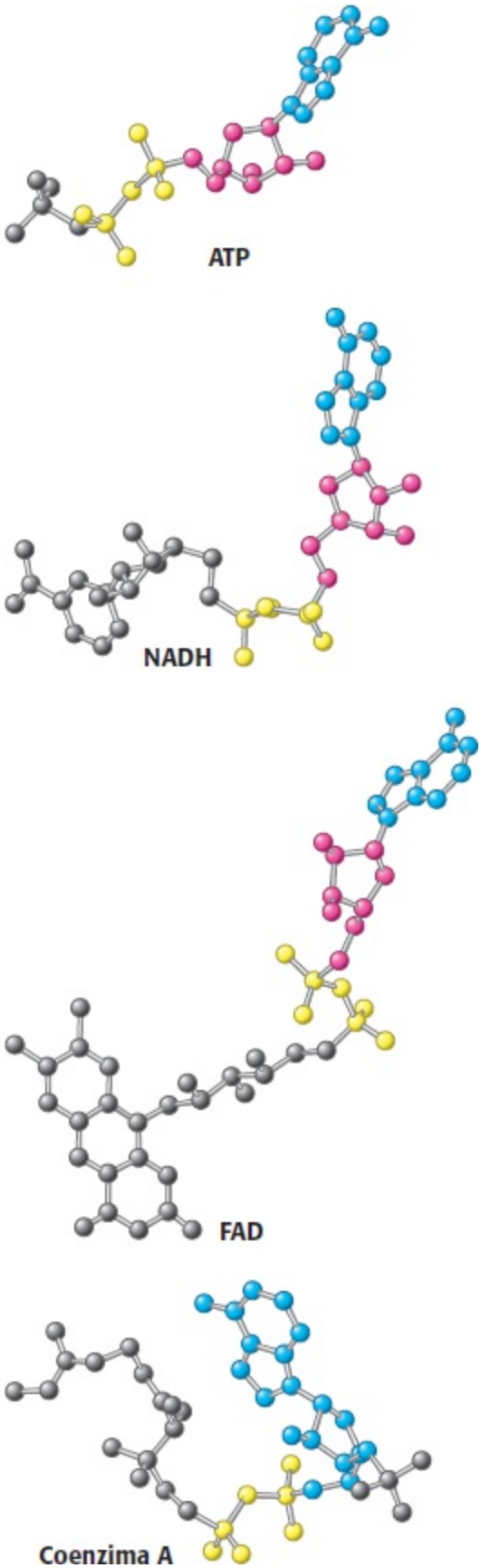


Figura 15.20 Adenosina difosfato (ADP) é um módulo antigo do metabolismo. Este componente fundamental é encontrado em moléculas importantes como ATP, NADH, FAD e coenzima A. A unidade adenina é exibida em azul; a unidade ribose, em vermelho; e a unidade difosfato, em amarelo.

Resumo

Todas as células transformam energia. Elas extraem energia de seu ambiente e utilizam-na para converter moléculas simples em componentes celulares.

15.1 O metabolismo é composto por muitas reações acopladas e interconectadas

O processo de transdução de energia ocorre por meio do metabolismo, uma rede extremamente integrada de reações químicas. O metabolismo pode ser subdividido em catabolismo (reações empregadas para extrair energia de compostos energéticos) e anabolismo (reações que utilizam esta energia para biossíntese). O conceito termodinâmico mais valioso para compreender a bioenergética é o de energia livre. Uma reação pode ocorrer espontaneamente apenas se a variação na energia livre (ΔG) for negativa. Uma reação termodinamicamente desfavorável pode ser impulsionada por outra favorável, que em muitos casos é a hidrólise do ATP.

15.2 ATP é a forma universal de energia livre usada pelos sistemas biológicos

A energia derivada do catabolismo é transformada em adenosina trifosfato. A hidrólise do ATP é exergônica e a energia liberada pode ser utilizada para impulsionar processos celulares como movimento, transporte ativo e biossínteses. Em condições celulares, a hidrólise do ATP desloca o equilíbrio de uma reação acoplada por um fator de 10^8. ATP, a forma universal de energia, usada pelos sistemas biológicos, é uma molécula rica em energia, pois contém duas ligações de anidrido fosfórico.

15.3 A oxidação de fontes de carbono é um gerador importante de energia celular

A formação de ATP é acoplada à oxidação de compostos de carbono, seja diretamente ou por meio da formação de gradientes iônicos. Os organismos fotossintéticos conseguem utilizar a luz para gerar tais gradientes. ATP é consumido na contração muscular e em outros movimentos celulares, no transporte ativo, nos processos de transdução de sinal e nas biossínteses. A extração de energia dos alimentos por organismos aeróbicos compreende três estágios. No primeiro estágio, grandes moléculas são quebradas em moléculas menores, como aminoácidos, carboidratos e ácidos graxos. No segundo estágio, estas moléculas pequenas são degradadas a algumas unidades simples que participam de muitas formas no metabolismo. Uma delas é a unidade acetil da acetil-CoA, um carreador de grupos acila ativados. O terceiro estágio do metabolismo é o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa, nos quais ATP é produzido à medida que os elétrons fluem para o O_2, o último aceptor de elétrons, e os compostos energéticos são completamente oxidados a CO_2.

15.4 As vias metabólicas contêm muitos padrões (*motifs*) recorrentes

O metabolismo é caracterizado por padrões em comum. Um pequeno número de carreadores ativados recorrentes, como ATP, NADH e acetil-CoA, transferem grupos ativados em muitas vias metabólicas. NADPH, que carreia dois elétrons com um alto potencial, fornece poder redutor na biossíntese de componentes celulares a partir de precursores mais oxidados. Muitos carreadores ativados derivam de vitaminas, pequenas moléculas orgânicas necessárias na alimentação de muitos organismos superiores. Além disso, tipos importantes de reações são utilizados de modo repetitivo nas vias metabólicas.

O metabolismo é regulado de várias maneiras. As concentrações de algumas enzimas críticas

são controladas pela regulação da velocidade de síntese e de degradação. Além disso, as atividades catalíticas de muitas enzimas são reguladas por interação alostérica (como na inibição por retroalimentação) e por modificação covalente. O movimento de muitos substratos nas células e nos compartimentos subcelulares também é controlado. A carga energética, que depende das quantidades relativas de ATP, ADP e AMP, participa na regulação metabólica. Uma carga energética elevada inibe as vias geradoras de ATP (catabólicas), enquanto estimula as vias que utilizam ATP (anabólicas).

Palavras-chave

adenosina trifosfato (ATP) (p. 434)
adição a ou formação de ligações duplas (p. 449)
anabolismo (p. 432)
carga energética (p. 450)
carreador ativado (p. 442)
catabolismo (p. 432)
fosforilação oxidativa (p. 441)
fototrófico (p. 432)
liase (p. 449)
metabolismo ou metabolismo intermediário (p. 431)
potencial de fosforilação (p. 450)
potencial de transferência de grupo fosforila (p. 437)
quimiotrófico (p. 432)
reação de isomerização (p. 448)
reação de ligação (p. 447)
reação de oxirredução (p. 447)
reação de transferência de grupo (p. 448)
reação hidrolítica (p. 448)
via anfibólica (p. 433)
vitamina (p. 445)

Questões

1. *Padrões complexos*. O que se entende por *metabolismo intermediário*?

2. *Opostos*. Diferencie anabolismo de catabolismo.

3. *Por que se preocupar com a alimentação?* Quais são as três utilizações principais da energia celular?

4. *Correlacione*

1. Fonte de energia celular	a. NAD^+
2. Carreador anabólico de elétrons	b. Coenzima A
3. Fototrófico	c. Precursor de coenzimas
4. Reação de carreador de elétrons catabólica	d. Produz energia e. Demanda energia
5. Reação de oxirredução	f. ATP

6. Carreador ativado de dois fragmentos de carbono	g. Transfere elétrons h. NADP+
7. Vitamina	
8. Anabolismo	i. Converte energia luminosa em energia química
9. Reação anfibólica	
10. Catabolismo	j. Utilizada no anabolismo e no catabolismo

5. *Energia para queimar*. Que fatores explicam o alto poder de transferência de grupo fosforila dos nucleosídios trifosfatos?

6. *De volta no tempo.* Explique o fato de o ATP, e não outro nucleosídio trifosfato, ser a forma universal de energia celular.

7. *Uma fonte universal.* Por que é sensato ter um único nucleotídio, o ATP, como a forma universal de energia celular?

8. *Condições ambientais*. A energia livre padrão da hidrólise do ATP é –30,5 kJ mol^{-1}(–7,3 kcal mol^{-1}).

$$ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + P_i$$

Que condições poderiam ser modificadas para alterar a energia livre de hidrólise?

9. *Força bruta?* As vias metabólicas muitas vezes contêm reações com valores positivos de energia livre padrão; todavia, as reações ainda ocorrem. Como isso é possível?

10. *Fluxo de energia*. Qual é o sentido de cada uma das reações que se seguem, quando os reagentes estão presentes inicialmente em quantidades equimolares? Utilize os dados da Tabela 15.1.

(a) ATP + creatina $\rightleftharpoons$ fosfocreatina + ADP
(b) ATP + glicerol $\rightleftharpoons$ glicerol 3-fosfato + ADP
(c) ATP + piruvato $\rightleftharpoons$ fosfoenolpiruvato + ADP
(d) ATP + glicose $\rightleftharpoons$ glicose 6-fosfato + ADP

11. *Uma dedução adequada.* Qual é a infomação dada pelo valor dos $\Delta G^{o'}$ da Tabela 15.1 sobre as velocidades relativas da hidrólise do pirofosfato e do acetil fosfato?

12. *Um doador potente*. Considere a seguinte reação:

$$ATP + piruvato \rightleftharpoons fosfoenolpiruvato + ADP$$

(a) Calcule $\Delta G^{o'}$ e K'_{eq} a 25°C para esta reação, utilizando os dados da Tabela 15.1.

(b) Qual é a razão de equilíbrio entre piruvato e fosfoenolpiruvato se a razão entre ATP e ADP for 10?

13. *Equilíbrio de isômeros*. Calcule $\Delta G^{o'}$ para a isomerização da glicose 6-fosfato em glicose 1-fosfato. Qual é a razão de equilíbrio entre glicose 6-fosfato e glicose 1-fosfato a 25°C?

14. *Acetato ativado*. A formação de acetil-CoA a partir de acetato é uma reação impulsionada por ATP:

$$Acetato + ATP + CoA \rightleftharpoons acetil\text{-}CoA + AMP + PP_i$$

(a) Calcule $\Delta G^{o'}$ para esta reação, utilizando os dados fornecidos neste capítulo.

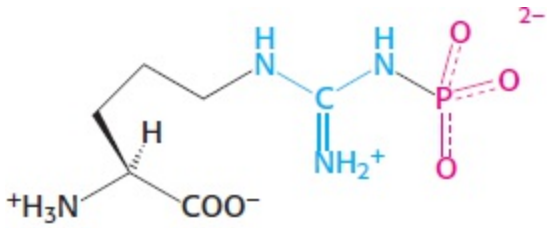
(b) O PP_i formado na reação anterior é rapidamente hidrolisado *in vivo* devido à onipresença da pirofosfatase inorgânica $\Delta G^{o'}$ Para a hidrólise do PP_i. $\Delta G^{o'}$ é –19,2 kJ mol^{-1} (–4,6 kcal mol^{-1}). Calcule $\Delta G^{o'}$ para a reação global, incluindo a hidrólise do pirofosfato. Que efeito a hidrólise de PP_i tem na formação de acetil-CoA?

15. *Força do ácido*. O p*K* de um ácido é uma medida de seu potencial de transferência de prótons.

(a) Deduza uma correlação entre $\Delta G^{o'}$ e p*K*.

(b) Qual é a $\Delta G^{o'}$ para a ionização do acido acético que tem um p*K* de 4,8?

16. *Raison d'être*. Os músculos de alguns invertebrados são ricos em arginina fosfato (fosfoarginina). Proponha uma função para este derivado de aminoácido.



Arginina fosfato

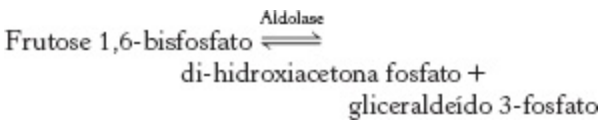
17. *Padrão recorrente*. Qual é a característica estrutural comum a ATP, FAD, NAD^+ e CoA?

18. *Ajuda ou obstáculo ergogênico?* A creatina é um suplemento alimentar popular, mas não testado.

(a) Qual é a base lógica bioquímica para sua utilização?

(b) Que tipo de exercício obteria mais benefícios com a suplementação de creatina?

19. *Condições padrão versus vida real 1.* A enzima aldolase catalisa a seguinte reação da via glicolítica.



Para esta reação $\Delta G^{o'}$ é + 23,8 kJ mol^{-1} (+ 5,7 kcal mol^{-1}), enquanto ΔG na célula é –1,3 kJ mol^{-1} (– 0,3 kcal mol^{-1}). Calcule a razão entre reagentes e produtos nas condições de equilíbrio e intracelulares. Utilizando seus resultados, explique como a reação pode ser endergônica em condições padrão e exergônica em condições intracelulares.

20. *Condições padrão versus vida real 2.* Na página 434, mostramos que uma reação A⇌B, com $\Delta G^{o'}$ = +13 kJ mol^{-1} (+ 4,0 kcal mol^{-1}) tem uma K_{eq} de 1,15 × 10^{-3}. K_{eq} aumentaria para 2,67 × 10^2 se a reação estivesse acoplada à hidrólise de ATP em condições padrão. O sistema produtor de ATP das células mantém a razão [ATP]/[ADP][P_i] em um nível alto, tipicamente na ordem de 500 M^{-1}. Calcule a razão B/A em condições celulares.

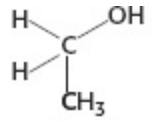
21. *Nem tudo é igual.* As concentrações de ATP, ADP e P_i diferem de um tipo celular para outro. Em consequência, a liberação de energia livre com a hidrólise do ATP varia entre as células. Utilizando o quadro que se segue, calcule ΔG para a hidrólise de ATP nas células do músculo, do fígado e do

cérebro. Em que tipo celular a energia livre da hidrólise do ATP é mais negativa?

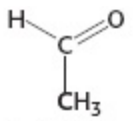
	ATP (mM)	ADP (mM)	P_i (mM)
Fígado	3,5	1,8	5,0
Músculo	8,0	0,9	8,0
Cérebro	2,6	0,7	2,7

22. *Questões de oxidação*. Examine os pares de moléculas e identifique a molécula mais reduzida em cada um deles.

(a)

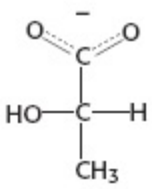


Etanol

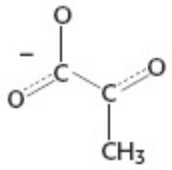


Acetaldeído

(b)

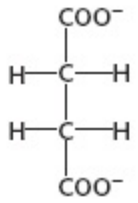


Lactato

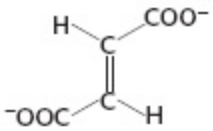


Piruvato

(c)

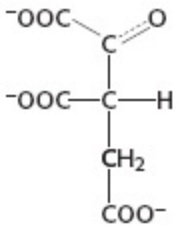


Succinato

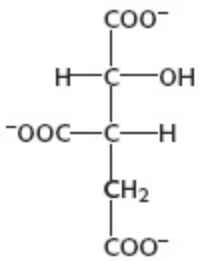


Fumarato

(d)

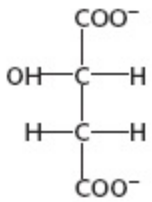


Oxalossuccinato

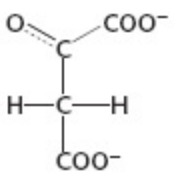


Isocitrato

(e)

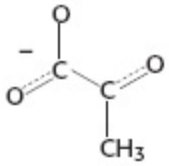


Malato

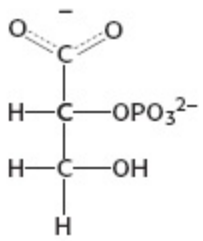


Oxaloacetato

(f)



Piruvato



2-Fosfoglicerato

23. *Remando "a favor da maré".* A glicólise é uma série de 10 reações encadeadas que transforma uma molécula de glicose em duas de piruvato com a síntese concomitante de duas moléculas de ATP (Capítulo 16). Para esse conjunto de reações $\Delta G^{o'}$ é –35,6 kJ mol^{-1} (– 8,5 kcal mol^{-1}), enquanto ΔG é – 76,6 kJ mol^{-1} (– 18,3 kcal mol^{-1}). Explique por que a liberação de energia é muito maior nas condições intracelulares do que nas condições padrão.

24. *Produtos de clivagem.* A digestão é o primeiro estágio na extração de energia dos alimentos, mas

nenhuma energia útil é obtida durante este estágio. Por que a digestão é considerada um estágio da extração de energia?

25. *Elétrons de alta energia*. Quais são os carreadores de elétrons ativados do catabolismo? E do anabolismo?

26. *Menos reverberação.* Tioésteres, comuns em bioquímica, são mais instáveis (ricos em energia) do que os ésteres de oxigênio. Explique o motivo.

27. *Classificação de reações*. Quais são as seis tipos comuns de reações vistas em bioquímica?

28. *Como manter o controle*. Quais são os três principais meios de controlar as reações metabólicas?

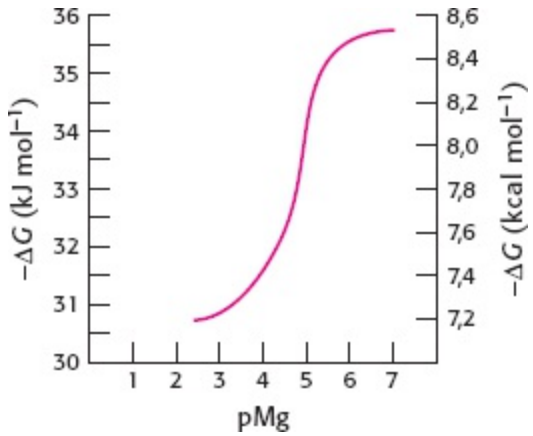
Questões | Integração de capítulos

29. *Cinética versus termodinâmica*. A reação do NADH com o oxigênio para produzir NAD^+ e H_2O é muito exergônica, embora a reação entre NADH e oxigênio ocorra muito lentamente. Por que uma reação termodinamicamente favorável não ocorre rapidamente?

30. *Sulfato ativo.* O fibrinogênio contém tirosina-*O*-sulfato. Proponha uma forma ativada de sulfato que possa reagir *in vivo* com a hidroxila aromática de um resíduo de tirosina em uma proteína para formar tirosina-*O*-sulfato.

Questões | Interpretação de dados

31. *Os opostos se atraem.* O gráfico a seguir mostra como a ΔG da hidrólise do ATP varia em função das concentrações de Mg^{2+} (pMg = – log $[Mg^{2+}]$).

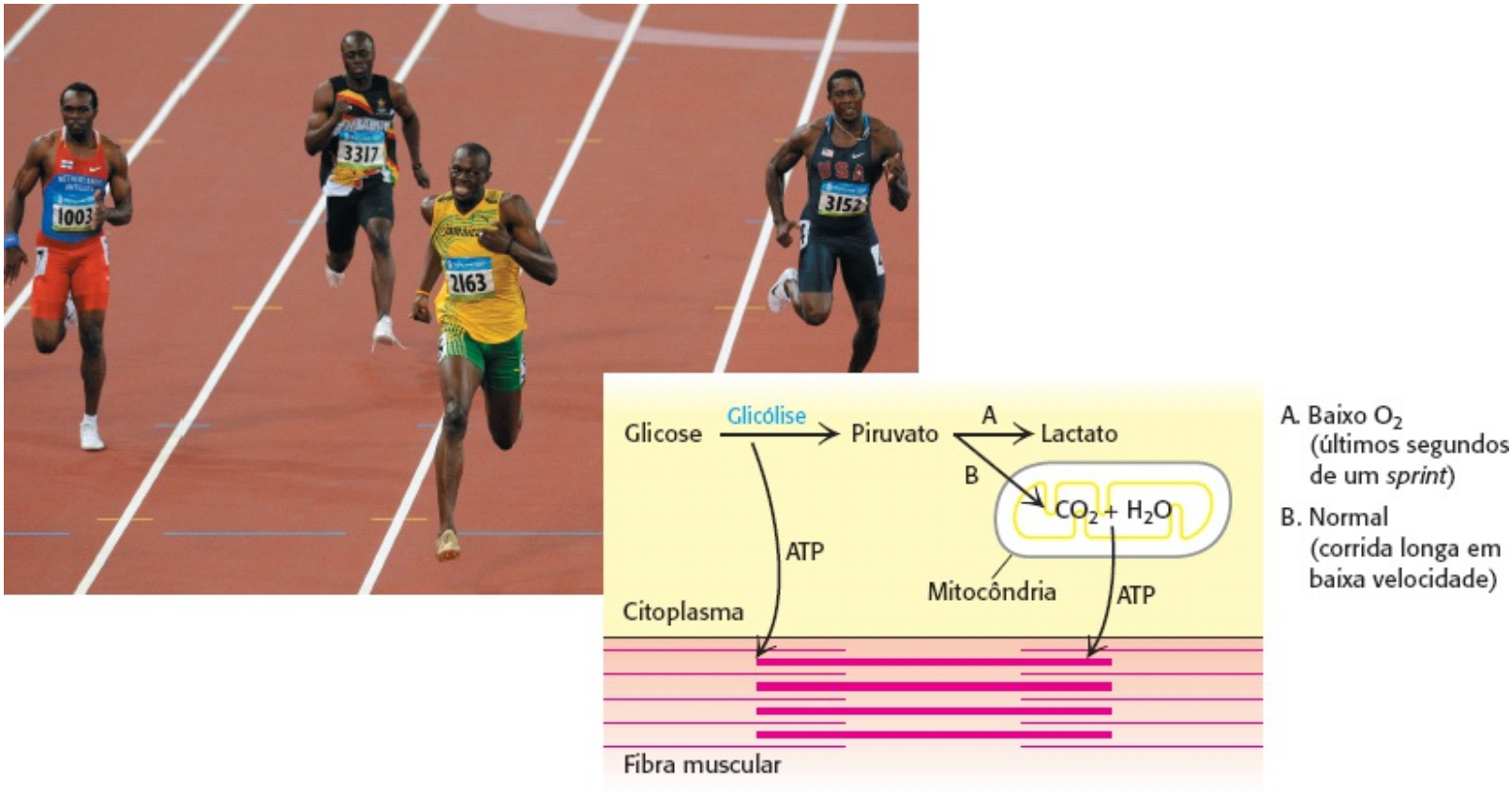


(a) Como a diminuição progressiva da $[Mg^{2+}]$ afeta ΔG da hidrólise do ATP?

(b) Explique este efeito.

Glicólise e Gliconeogênese

16



Usain Bolt dá uma arrancada para bater o recorde mundial nas finais de 200 m das Olimpíadas de Pequim em 2008. O metabolismo da glicose consegue produzir ATP para impulsionar a contração muscular. Durante um *sprint* (corrida de velocidade), quando as necessidades de ATP ultrapassam o aporte de oxigênio, como seria o caso de Bolt, a glicose é metabolizada em lactato. Quando o aporte de oxigênio é adequado, a glicose é metabolizada de modo mais eficiente em dióxido de carbono e água. [Reix-Liews/For Photo/Corbis.]

SUMÁRIO

16.1 Aglicólise é uma via de conversão de energia em muitos organismos

16.2 Avia glicolítica é rigidamente controlada

16.3 Aglicose pode ser sintetizada a partir de precursores não carboidratos

16.4 Agliconeogênese e a glicólise são reguladas reciprocamente

A primeira via metabólica que deparamos é a glicólise, uma via antiga empregada por uma gama de organismos. *A glicólise é a sequência de reações que metaboliza uma molécula de glicose em duas de piruvato com a produção concomitante de duas moléculas de ATP.* Este processo é anaeróbico (*i.e.*, não exige O_2), pois evoluiu antes do acúmulo de quantidades substanciais de oxigênio na atmosfera. O piruvato pode ser a seguir processado de modo anaeróbico a lactato (*fermentação láctica*) ou a etanol (*fermentação alcoólica*). Em condições aeróbicas, o piruvato

pode ser oxidado por completo a CO_2, produzindo muito mais ATP, como será descrito nos Capítulos 17 e 18. A Figura 16.1 mostra alguns possíveis destinos do piruvato produzido pela glicólise.

Como a glicose é um composto energético precioso, os produtos metabólicos, como piruvato e lactato, são recuperados para sintetizar glicose no processo de *gliconeogênese*. Embora a glicólise e a gliconeogênese compartilhem algumas enzimas, as duas vias não são simplesmente o reverso uma da outra. Em particular, as etapas altamente exergônicas e irreversíveis da glicólise são contornadas na gliconeogênese. As duas vias são reguladas reciprocamente, de modo que não ocorrem ao mesmo tempo de forma significativa na mesma célula.

Glicólise
A palavra glicólise é derivada do grego, *glykýs*, "doce" e *lýsis*, "dissolução".

Nosso entendimento do metabolismo da glicose, em especial da glicólise, tem uma história rica que remonta a outras épocas. De fato, o desenvolvimento da bioquímica e os primeiros esboços da glicólise ocorreram ao mesmo tempo. Hans Buchner e Eduard Buchner fizeram, quase por acidente, uma descoberta importante em 1897. Eles estavam interessados em produzir extratos de levedura acelulares para possível utilização terapêutica. Estes extratos precisavam ser conservados sem o emprego de antissépticos, como o fenol e, portanto, decidiram experimentar a sacarose, um conservante muito utilizado na química culinária. Eles obtiveram um resultado surpreendente: a sacarose era rapidamente fermentada a álcool pelo suco de levedura. A importância desse achado foi imensa. *Os Buchner demonstraram pela primeira vez que a fermentação poderia ocorrer fora de células vivas.* O ponto de vista aceito em sua época (estabelecido por Louis Pasteur em 1860) era de que a fermentação estava de modo indissolúvel ligada às células vivas. Essa descoberta dos Buchner, ao acaso, refutou este dogma e abriu as portas para a bioquímica moderna. A descoberta destes pesquisadores inspirou a pesquisa de compostos bioquímicos que catalisam a conversão de sacarose em álcool. *O estudo do metabolismo tornou-se o estudo da química.*

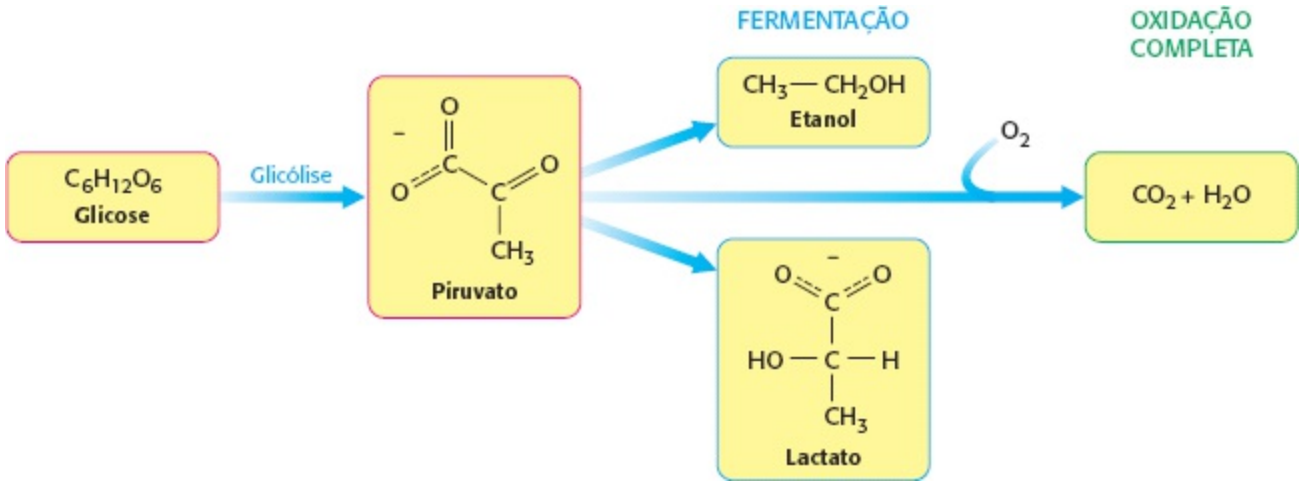


Figura 16.1 Alguns destinos da glicose.

Estudos de extratos de músculos mostraram então que muitas das reações da fermentação láctica eram as mesmas da fermentação alcoólica. *Esta descoberta excitante revelou a existência de uniformidade da bioquímica.* A via glicolítica completa foi elucidada em 1940, principalmente

devido às contribuições de Gustav Embden, Otto Meyerhof, Carl Neuberg, Jacob Parnas, Otto Warburg, Gerty Cori e Carl Cori. A glicólise também é conhecida como *via de Embden–Meyerhof*.

Enzima
Enzima é um termo criado por Friedrich Whihelm Kühne, em 1878, para designar substâncias cataliticamente ativas que antes eram chamadas de fermentos. É derivado do grego *en,* "dentro", e *zýme* "levedura".

A glicose é produzida a partir de carboidratos da alimentação

Tipicamente consumimos uma quantidade generosa de amido e menos glicogênio. Esses carboidratos complexos têm de ser convertidos em carboidratos mais simples para a absorção intestinal e o transporte no sangue. Amido e glicogênio são digeridos basicamente pela enzima pancreática, α-*amilase* e, em menor grau, pela α-amilase salivar. A amilase cliva as ligações α-1,4 do amido e do glicogênio, mas não as ligações α-1,6. Os produtos são os di e trissacarídeos, maltose e maltotriose. O material não digerível por causa das ligações α-1,6 é chamado de *dextrina limite*.

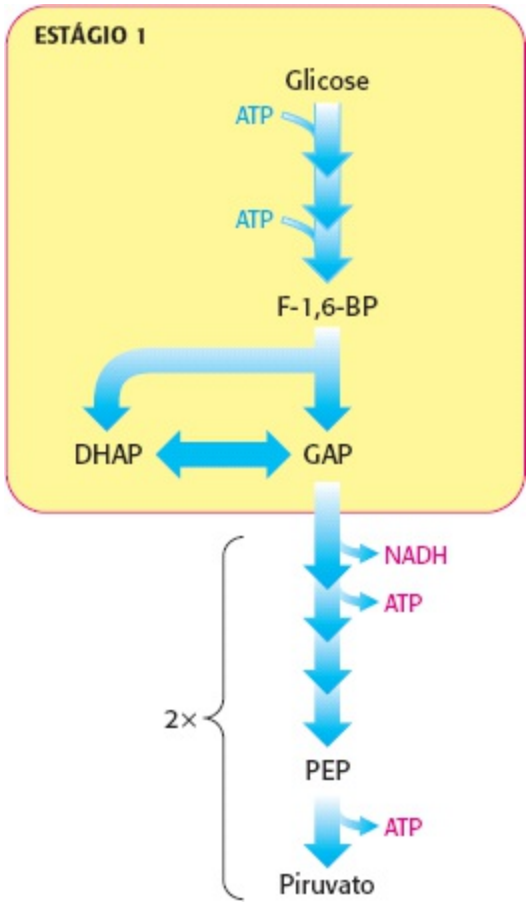
A *maltase* cliva maltose em duas moléculas de glicose, enquanto a α-*glicosidase* digere maltotriose e outros oligossacarídios que tenham escapado da digestão pela amilase. A α-*dextrinase* digere a dextrina limite. Maltase e α-glicosidase estão localizadas na superfície das células intestinais, assim como a *sacarase*, uma enzima que degrada a sacarose, oriunda dos vegetais, em frutose e glicose. A enzima *lactase* é responsável por degradar a lactose (carboidrato do leite) em glicose e galactose. Os monossacarídios são transportados para as células que revestem o intestino e, então, para a corrente sanguínea.

A glicose é um composto energético importante para a maioria dos organismos

A glicose é um composto energético comum e importante. Nos mamíferos, é o único composto energético que o cérebro utiliza em condições que não o jejum e o único que as hemácias conseguem metabolizar. De fato, quase todos os organismos utilizam glicose, e a maioria processa-a de modo semelhante. Lembre-se do que foi dito no Capítulo 11, que existem muitos carboidratos. Por que é a glicose, e não outros monossacarídios, a fonte prominente de energia? Podemos especular vários motivos. Primeiro, a glicose é um de vários monossacarídios formados a partir do formaldeído em condições prebióticas e, portanto, já existia como fonte de energia na época dos sistemas bioquímicos primitivos. Segundo, a glicose tem baixa tendência, em relação aos outros monossacarídios, a glicosilar proteínas de modo não enzimático. Nas suas formas de cadeia aberta, os monossacarídios contêm grupos carbonila que conseguem reagir com os grupos amina das proteínas e formar bases de Schiff, que se rearranjam para originar uma ligação aminocetona mais estável. Tais proteínas modificadas de modo inespecífico frequentemente não funcionam de maneira efetiva. A glicose apresenta uma forte tendência a existir na conformação de anel e, em consequência, relativamente pouca tendência a modificar proteínas. Lembre-se de que todos os grupamentos hidroxila na conformação em anel da β-glicose são equatoriais, contribuindo para a elevada estabilidade relativa da mesma (Seção 11.1).

16.1 A glicólise é uma via de conversão de energia em muitos organismos

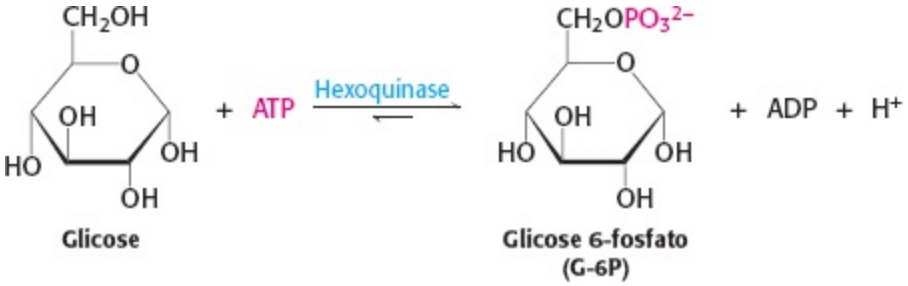
Começamos agora nosso estudo da via glicolítica. Esta via é comum em praticamente todas as células, tanto procarióticas quanto eucarióticas. Nas células eucarióticas, a glicólise ocorre no citoplasma. Consideramos que esta via compreende dois estágios (Figura 16.2). O estágio 1 é a fase de retenção e preparação. Nenhum ATP é produzido neste estágio. O estágio 1 começa com a conversão de glicose em frutose 1,6-bisfosfato, que consiste em três etapas: fosforilação, isomerização e uma segunda reação de fosforilação. *A estratégia dessas etapas iniciais da glicólise é reter a glicose na célula e formar um composto que pode ser prontamente clivado em unidades fosforiladas de três carbonos.* O estágio 1 termina com a clivagem da frutose 1,6-bisfosfato em dois fragmentos de três carbonos. Estas unidades resultantes de três carbonos são prontamente interconversíveis. No estágio 2, forma-se ATP quando os fragmentos de três carbonos são oxidados a piruvato.



Primeiro estágio da glicólise. O primeiro estágio da glicólise começa com a fosforilação da glicose pela hexoquinase e termina com a isomerização da di-hidroxiacetona fosfato a gliceraldeído 3-fosfato.

A hexoquinase retém a glicose dentro da célula e começa a glicólise

A glicose entra nas células graças a proteínas transportadoras específicas (p. 481) e tem um destino principal: *é fosforilada pelo ATP para formar glicose 6-fosfato.* Esta etapa é notável por dois motivos: (1) a glicose 6-fosfato não consegue atravessar a membrana, pois não é um substrato para os transportadores de glicose e (2) o acréscimo do grupo fosforila desestabiliza a glicose, facilitando assim o prosseguimento do seu metabolismo. A transferência do grupo fosforila do ATP para o grupo hidroxila no carbono 6 da glicose é catalisada pela *hexoquinase*.



Glicose **Glicose 6-fosfato (G-6P)**

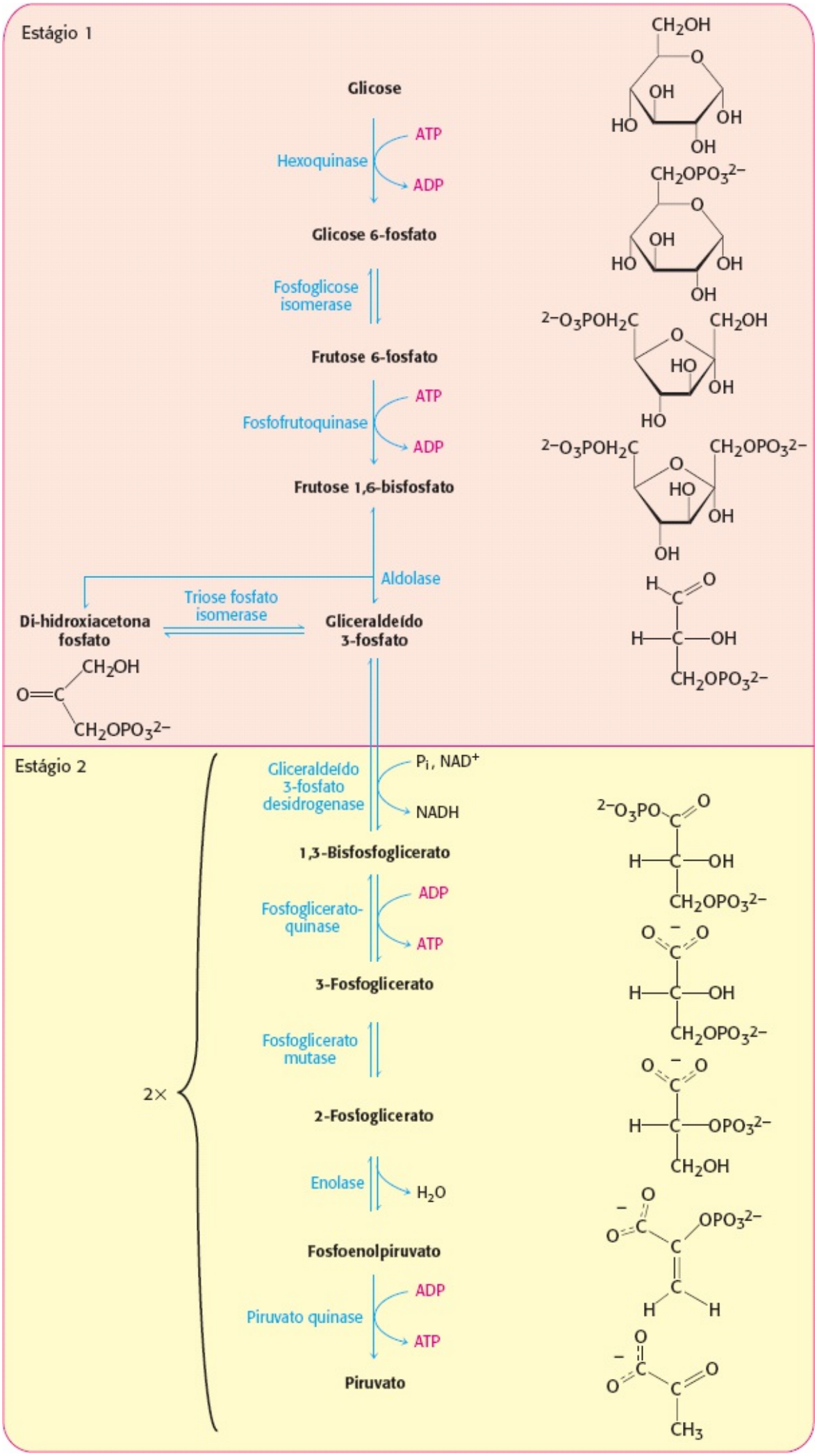

Estágio 1
Glicose
Hexoquinase
ATP
ADP
Glicose 6-fosfato
Fosfoglicose isomerase
Frutose 6-fosfato
Fosfofrutoquinase
ATP
ADP
Frutose 1,6-bisfosfato
Aldolase
Triose fosfato isomerase
Di-hidroxiacetona fosfato
Gliceraldeído 3-fosfato
Estágio 2
2×
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
Pi, NAD+
NADH
1,3-Bisfosfoglicerato
Fosfoglicerato-quinase
ADP
ATP
3-Fosfoglicerato
Fosfoglicerato mutase
2-Fosfoglicerato
Enolase
H2O
Fosfoenolpiruvato
Piruvato quinase
ADP
ATP
Piruvato

Figura 16.2 Estágios da glicólise. A via glicolítica pode ser dividida em dois estágios: (1) a glicose é retida, desestabilizada e clivada em duas moléculas de três carbonos interconversíveis produzidas pela clivagem da molécula de seis carbonos, frutose; e (2) ATP é produzido.

A transferência de grupos fosforila é uma reação fundamental em bioquímica. *Quinases* são enzimas que catalisam a transferência de um grupo fosforila do ATP para um aceptor. Em seguida, a hexoquinase catalisa a transferência de uma fosforila do ATP para vários monossacarídios com seis carbonos (*hexoses*), como glicose e manose. *A hexoquinase, como a adenilato quinase* (Seção 9.4) *e todas as outras quinases, necessita de* Mg^{2+} *(ou outro íon metálico bivalente, como* Mn^{2+}*) para a sua atividade.* O íon metálico bivalente forma um complexo com o ATP.

Os estudos de cristalografia de raios X da hexoquinase de levedura revelaram que a ligação de glicose induz uma grande mudança conformacional da enzima. A hexoquinase consiste em dois lobos, que se movem na direção de um para o outro quando a glicose se liga a enzima (Figura 16.3). Quando da ligação com a glicose, um lobo gira 12° em relação ao outro, resultando em um movimento de até 8 Å no arcabouço peptídico. Fecha-se a fenda entre os dois lobos e a glicose ligada fica envolta pela proteína, exceto a hidroxila do carbono 6, que aceitará a fosforila do ATP. O fechamento da fenda da hexoquinase é um exemplo marcante do papel do *encaixe induzido* (do inglês, *induced fit*) na ação da enzima (Seção 8.3).

As alterações estruturais induzidas pela glicose são significativas em dois aspectos. Primeiro, o ambiente em torno da glicose torna-se muito mais apolar, o que favorece a doação da fosforila terminal do ATP. Segundo, as mudanças conformacionais induzidas pelo substrato dentro da quinase capacitam-na a discriminar a H_2O como substrato. O fechamento da fenda mantém as moléculas de água afastadas, longe do sítio ativo. Se a hexoquinase fosse rígida, uma molécula de água ao ocupar o centro de ligação para o —CH_2OH da glicose poderia atacar a fosforila γ do ATP, formando ADP e P_i. Em outras palavras, uma quinase rígida seria também provavelmente uma ATPase. É interessante observar que outras quinases que tomam parte da glicólise, fosfofrutoquinase, fosfogliceratoquinase e piruvato quinase, também contêm fendas entre lóbulos que se fecham quando o substrato se liga, embora as estruturas destas enzimas sejam diferentes em outros aspectos. *O fechamento da fenda induzido pelo substrato é uma característica comum das quinases.*

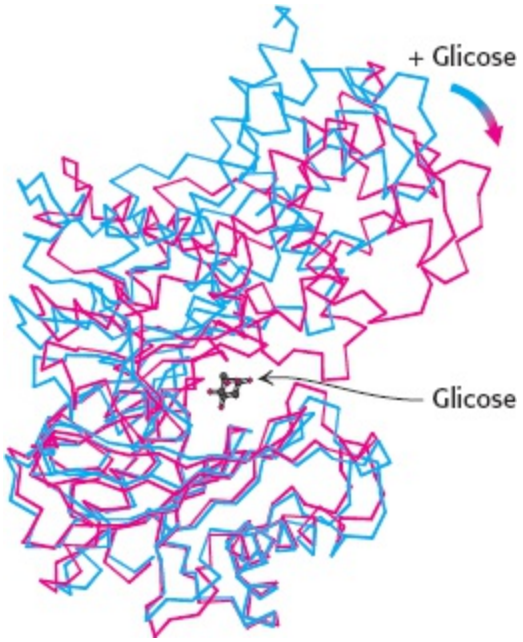
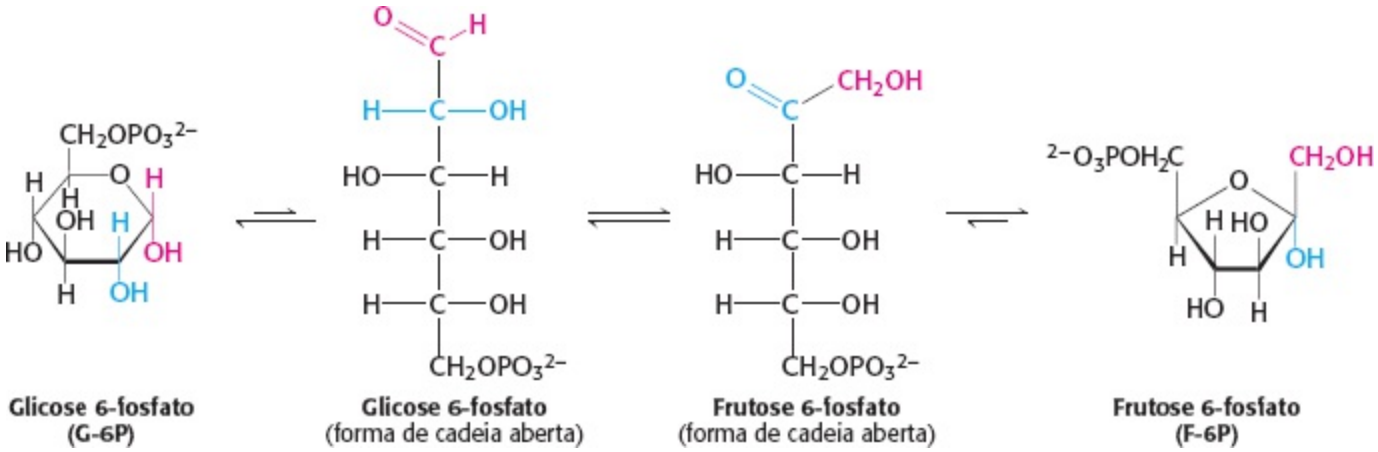


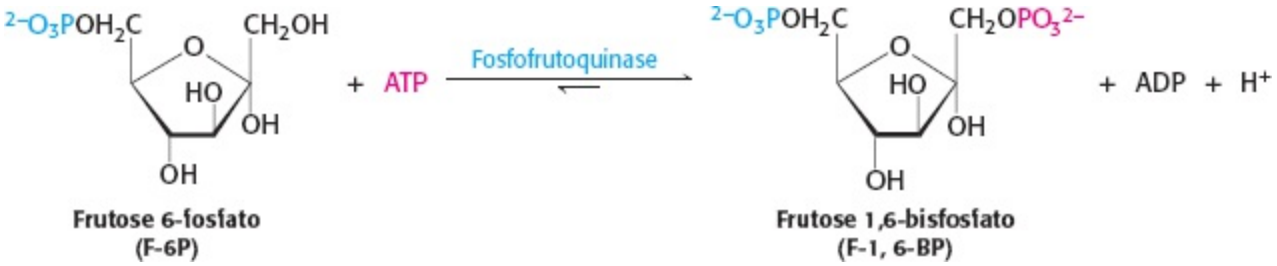
Figura 16.3 Encaixe induzido na hexoquinase. Como exibido em azul, os dois lobos da hexoquinase estão separados na ausência de glicose. A conformação da hexoquinase muda de modo marcante quando a glicose se liga, como mostrado em vermelho. *Observe* que dois lobos da enzima juntam-se e envolvem o substrato, produzindo o ambiente necessário para a catálise. [Cortesia do Dr. Thomas Steitz.]

A frutose 1,6-bisfosfato é gerada a partir da glicose 6-fosfato

A etapa seguinte da glicólise é a isomerização da *glicose 6-fosfato* em *frutose 6-fosfato*. Lembre que a forma de cadeia aberta da glicose tem um aldeído no carbono 1, enquanto a forma de cadeia aberta da frutose tem uma cetona no carbono 2. Portanto, a isomerização da glicose 6-fosfato em frutose 6-fosfato é uma *conversão de uma aldose em uma cetose*. A reação catalisada pela fosfoglicose isomerase ocorre em várias etapas, porque tanto a glicose 6-fosfato quanto a frutose 6-fosfato estão presentes principalmente nas formas cíclicas. A enzima tem de inicialmente abrir o anel hexagonal da glicose 6-fosfato, catalisar a isomerização e a seguir promover a formação do anel pentagonal da frutose 6-fosfato.



Uma segunda reação de fosforilação segue-se à etapa de isomerização. *A frutose 6-fosfato é fosforilada à custa de ATP à frutose 1,6-bisfosfato (F-1, 6BP)*. O prefixo *bis-* do bisfosfato significa dois fosfatos separados, enquanto o prefixo *di-* no difosfato (como na adenosina difosfato) significa que dois fosfatos estão presentes unidos por uma ligação anidrido.

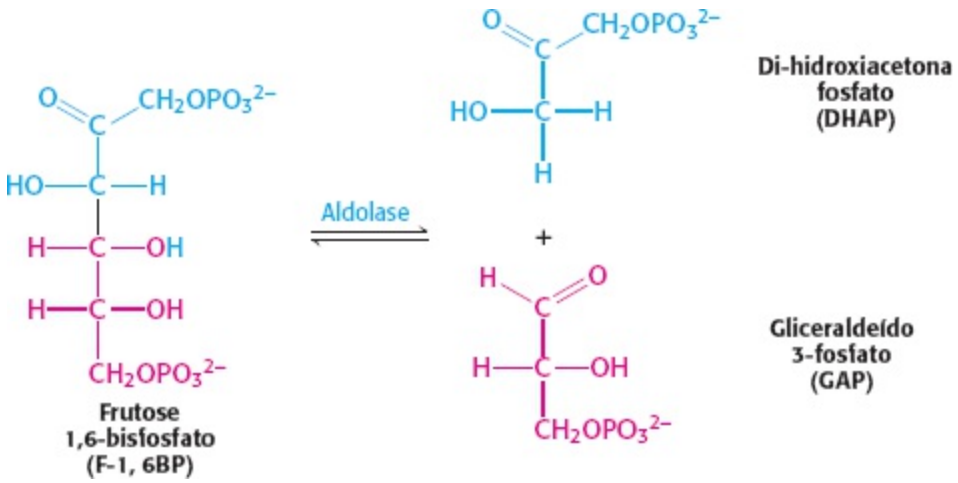


Esta reação é catalisada pela *fosfofrutoquinase* (PFK), uma enzima alostérica que regula a velocidade da glicólise. Como aprenderemos, esta enzima é fundamental no metabolismo de muitas moléculas em todas as partes do organismo.

O carboidrato de seis carbonos é clivado em dois fragmentos de três carbonos

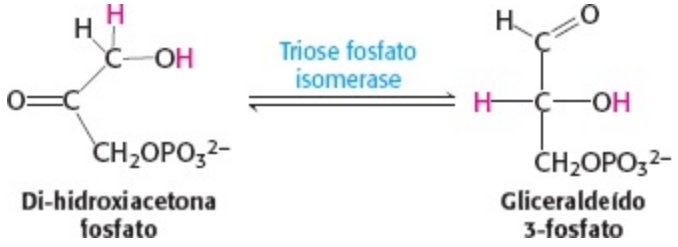
A frutose 1,6-bisfosfato recém-sintetizada é clivada em *gliceraldeído 3-fosfato* (GAP) e *di-*

hidroxiacetona fosfato (DHAP), completando o estágio 1 da glicólise. Os produtos das etapas restantes da glicólise consistem em unidades de três carbonos e não de seis carbonos.



Esta reação, que é prontamente reversível, é catalisada pela *aldolase*. Esta enzima deriva seu nome da natureza da reação reversível, uma condensação aldólica.

O gliceraldeído 3-fosfato está na via direta da glicólise, mas não a di-hidroxiacetona fosfato. A não ser que exista uma forma de converter a di-hidroxiacetona fosfato em gliceraldeído 3-fosfato, será perdido um fragmento de três carbonos utilizável para produzir ATP. Estes compostos são isômeros que prontamente se interconvertem: di-hidroxiacetona é uma cetose, enquanto gliceraldeído 3-fosfato é uma aldose. A isomerização desses carboidratos fosforilados com três carbonos é catalisada pela *triose fosfato isomerase* (TIM ou TPI; Figura 16.4).



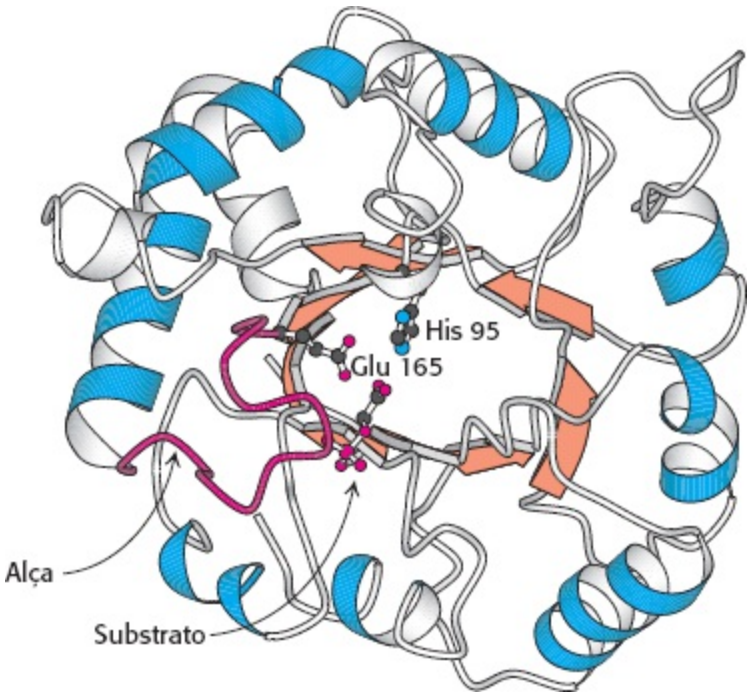


Figura 16.4 Estrutura da triose fosfato isomerase. Esta enzima é constituída por um cerne de oito fitas β-paralelas (laranja) rodeadas por oito α-hélices (azul). Este padrão estrutural, dito barril αβ, é encontrado também nas enzimas glicolíticas aldolase, enolase e piruvato quinase. *Observe* que a histidina 95 e o glutamato 165, componentes essenciais do sítio ativo da triose fosfato isomerase, localizam-se no barril. Uma alça (vermelho) fecha o sítio ativo quando o substrato se liga [Desenhada a partir de 2YPI.pdb.]

Esta reação é rápida e reversível. No equilíbrio, 96% da triose fosfato são representados pela di-hidroxiacetona fosfato. Contudo, a reação processa-se prontamente de di-hidroxiacetona para gliceraldeído 3-fosfato, porque as reações subsequentes da glicólise removem esse produto.

Agora vemos a importância da isomerização da glicose 6-fosfato em frutose 6-fosfato e sua fosforilação subsequente para formar frutose 1,6-bisfosfato. Se a clivagem aldólica ocorresse na glicose (aldose), resultariam um fragmento de dois e um de quatro carbonos. Duas vias metabólicas diferentes, uma para processar o fragmento de dois carbonos e a outra para processar o de quatro carbonos seriam necessárias para extrair energia. A isomerização da frutose (cetose) seguida pela clivagem aldólica origina dois fragmentos fosforilados de três carbonos interconversíveis que serão oxidados nas etapas tardias da glicólise para capturar energia na forma de ATP.

Mecanismo | A triose fosfato isomerase recupera um fragmento de três carbonos

Muito se conhece acerca do mecanismo catalítico da triose fosfato isomerase. A TPI (TIM) catalisa a transferência de um hidrogênio do carbono 1 para o carbono 2, uma reação de oxirredução intramolecular. Esta isomerização de uma cetose em uma aldose ocorre por *um intermediário enediol* (Figura 16.5).

Estudos de cristalografia de raios X e outros mostraram que o glutamato 165 é catalisador ácido-base geral: ele abstrai um próton (H^+) do carbono 1 e, a seguir, o doa ao carbono 2. Contudo, o grupo carboxila do glutamato 165 por si só, não é suficientemente básico para afastar um próton de um átomo de carbono adjacente a um grupo carbonila. A histidina 95 auxilia a catálise, doando um próton para estabilizar a carga elétrica negativa que se desenvolve no grupo carbonila em C-2.

Duas características desta enzima se destacam. Primeiro, a TPI (TIM) exibe uma grande potência catalítica. Ela acelera a isomerização em um fator de 10^{10}, em comparação com a velocidade obtida por um catalisador básico comum, como o íon acetato. De fato, a razão k_{cat}/K_M para a isomerização de gliceraldeído 3-fosfato é de $2 \times 10^8\ M^{-1}s^{-1}$, o que está próximo do limite controlado por difusão. Em outras palavras, a catálise ocorre sempre que a enzima e o substrato se encontram. A etapa limitante na catálise é o encontro controlado pela difusão do substrato com a enzima. A TPI (TIM) é um exemplo de *enzima cineticamente perfeita* (Seção 8.4). Segundo, a TPI (TIM) suprime uma reação colateral indesejável, a decomposição do intermediário enediol em metilglioxal e ortofosfato.

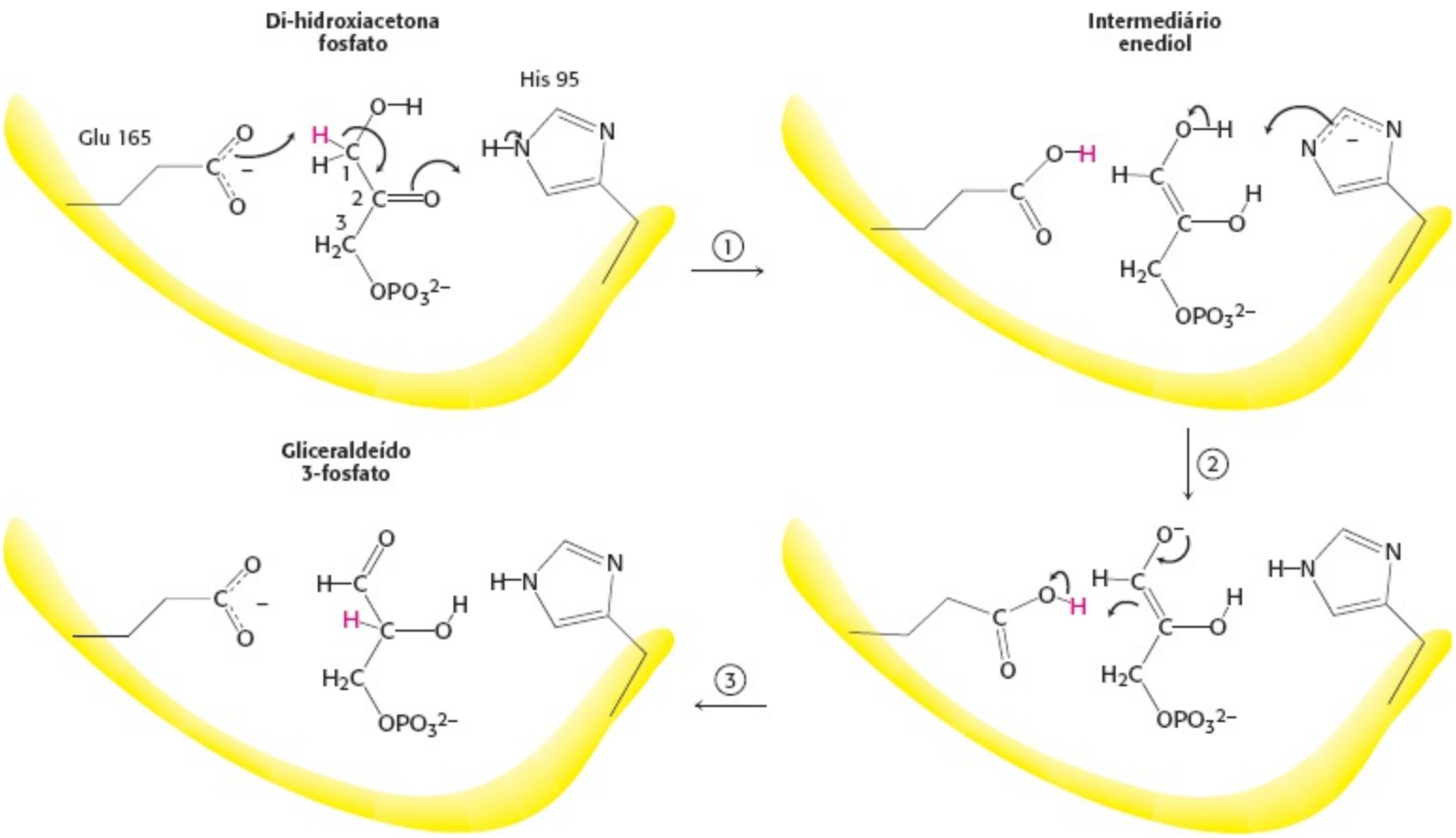
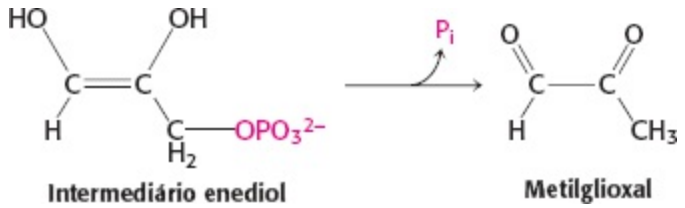


Figura 16.5 Mecanismo catalítico da triose fosfato isomerase. (1) O glutamato 165 atua como uma base geral abstraindo um próton (H^+) do carbono 1. A histidina 95 age como um ácido geral, doando um próton ao átomo de oxigênio ligado ao carbono 2, formando um enediol intermediário. (2) O ácido glutâmico, agora atuando como um ácido geral, doa um próton ao C-2, enquanto a histidina remove um próton do grupo OH do C-1. (3) O produto é formado, e o glutamato e a histidina retornam às suas formas ionizada e neutra, respectivamente.

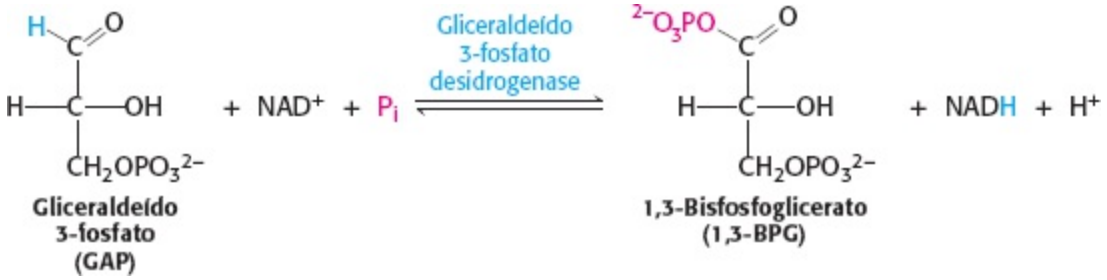


Em solução, esta reação fisiologicamente inútil é 100 vezes mais rápida do que a isomerização. Além disso, metilglioxal é um composto muito reativo que consegue modificar a estrutura e função de várias biomoléculas, inclusive de proteínas e DNA. A reação de metilglioxal com uma biomolécula é um exemplo de reações deletérias ditas produtos finais de glicação avançada, abordados anteriormente (AGE, Seção 11.1). Assim sendo, a TPI (TIM) precisa impedir que o enediol saia da enzima. Este intermediário lábil é retido no sítio ativo pelo movimento de uma alça de 10 aminoácidos (Figura 16.4). Esta alça funciona como uma "tampa" sobre o sítio ativo, fechando-o quando o enediol está presente e reabrindo-o quando se completa a isomerização. *Vemos aqui um exemplo notável de como evitar uma reação alternativa indesejável: o sítio ativo é mantido fechado até que a reação desejável ocorra.*

Portanto, são formadas duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato a partir de uma molécula de frutose 1,6-bisfosfato pela ação sequencial da aldolase e da triose fosfato isomerase. A economia metabólica é evidente nesta sequência de reações. A isomerase conduz a di-hidroxiacetona fosfato para a via glicolítica principal; não é necessário um conjunto separado de reações.

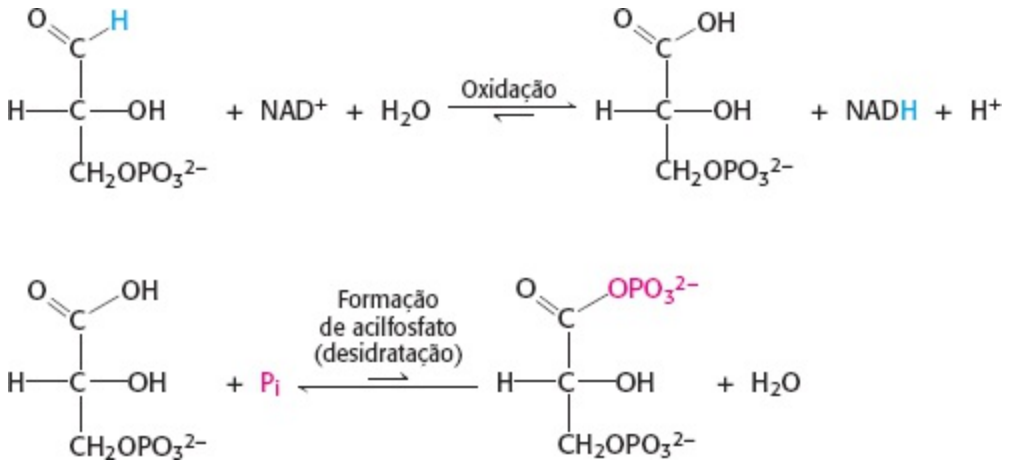
A oxidação de um aldeído em um ácido impulsiona a formação de um composto com alto potencial de transferência de fosforila

As etapas anteriores da glicólise transformaram uma molécula de glicose em duas de gliceraldeído 3-fosfato, mas até agora não houve a extração de energia. Pelo contrário, foram "investidas" até aqui duas moléculas de ATP. Sigamos agora para o segundo estágio da glicólise, uma série de etapas que captam parte da energia contida no gliceraldeído 3-fosfato na forma de ATP. A reação inicial nesta sequência é a *conversão de gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato* (1,3-BPG), uma reação catalisada *pela gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.*



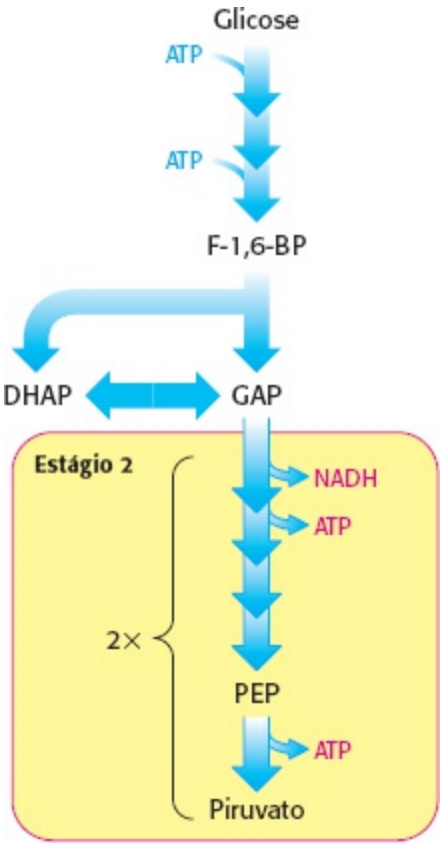
O 1,3-bisfosfoglicerato é um acilfosfato, que é um anidrido misto de ácido fosfórico e ácido carboxílico. Tais compostos têm alto potencial de transferência de fosforila; um de seus grupamentos fosforila é transferido para o ADP na etapa seguinte da glicólise.

A reação catalisada pela gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase pode ser vista como o somatório de dois processos: a *oxidação* de aldeído a ácido carboxílico pelo NAD^+ e a *junção* do ácido carboxílico e ortofosfato para formar o produto acilfosfato.



A primeira reação é termodinamicamente bastante favorável, com uma variação de energia livre padrão, $\Delta G^{o'}$, de aproximadamente –50 kJ mol^{-1} (–12 kcal mol^{-1}), enquanto a segunda reação é bastante desfavorável, com uma variação de energia livre padrão da mesma grandeza, mas de sinal oposto. Se essas duas reações fossem simplesmente sucessivas, a segunda reação teria enorme energia de ativação e, portanto, não ocorreria em uma velocidade biologicamente significativa. Estes dois processos *têm de estar acoplados*, de modo que a oxidação favorável do aldeído possa ser utilizada para impulsionar a formação do acilfosfato. Como estas reações estão acopladas*? A explicação é um intermediário, formado como resultado da oxidação do aldeído, que está unido à enzima por uma ligação tioéster.* Os tioésteres são compostos de alta energia encontrados em muitas vias bioquímicas (Seção 15.4). Este intermediário reage com ortofosfato para formar 1,3-

bisfosfoglicerato, um composto de alta energia.



Segundo estágio da glicólise. A oxidação de fragmentos de três carbonos produz ATP.

O intermediário tioéster tem maior energia livre que o ácido carboxílico livre. A oxidação favorável e a fosforilação desfavorável estão acopladas pelo intermediário tioéster, que preserva boa parte da energia liberada da oxidação. Vemos aqui a *utilização de um intermediário unido à enzima covalentemente como mecanismo de acoplamento energético.* Um perfil da energia livre da reação da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, comparado a um processo hipotético no qual a reação ocorresse sem este intermediário, revela como este intermediário permite que um processo favorável impulsione um desfavorável (Figura 16.6).

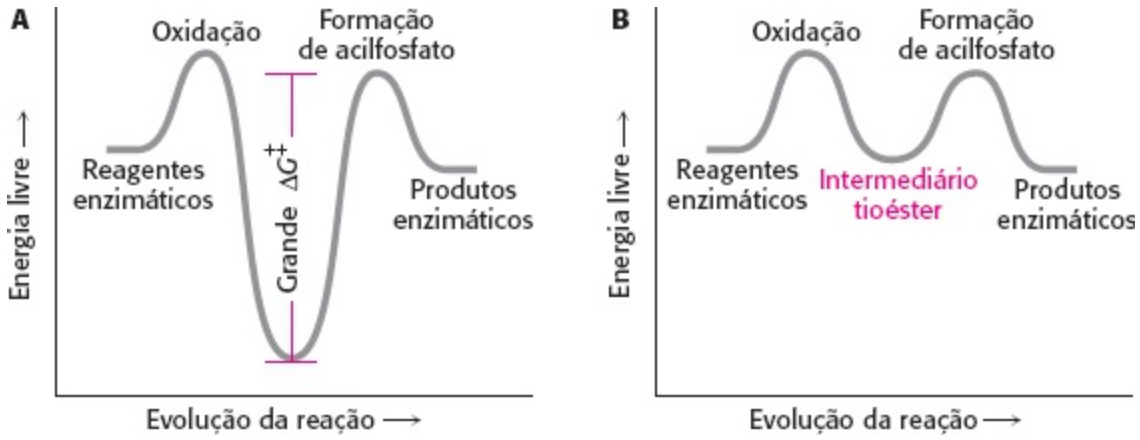


Figura 16.6 Perfis de energia livre da oxidação de gliceraldeído seguida pela formação do acilfosfato. **A.** Um caso hipotético, sem acoplamento entre os dois processos. A segunda etapa precisa ter uma grande barreira de ativação, tornando a reação muito mais lenta. **B.** O caso real, com as duas reações acopladas por um intermediário tioéster.

Mecanismo | A fosforilação é acoplada à oxidação de gliceraldeído 3-fosfato por um intermediário tioéster

O sítio ativo da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase inclui um resíduo de cisteína reativo, bem como NAD^+ e uma histidina crucial (Figura 16.7). Consideremos em detalhes como estes compostos cooperam no mecanismo da reação (Figura 16.8). Na etapa 1, o substrato aldeído reage com o grupo sulfidrila da cisteína 149 da enzima para formar um hemitioacetal. A etapa 2 é a *transferência de um íon hidreto para uma molécula de NAD^+ que está firmemente ligada à enzima e é adjacente ao resíduo de cisteína.* Esta reação é favorecida pela desprotonação do hemitioacetal pela histidina 176. Os produtos desta reação são a coenzima reduzida NADH e um intermediário tioéster. *Este intermediário tioéster tem energia livre próxima a dos reagentes* (Figura 16.6). Na etapa 3, o NADH formado a partir da oxidação do aldeído deixa a enzima e é trocado por uma segunda molécula de NAD^+. Esta etapa é importante porque a carga elétrica positiva do NAD^+ polariza o intermediário tioéster para facilitar o "ataque" pelo ortofosfato. Na etapa 4, o ortofosfato "ataca" o tioéster para formar 1,3-BPG e liberar o resíduo de cisteína. Este exemplo ilustra a essência das transformações energéticas e do próprio metabolismo: a energia liberada pela oxidação do carbono é convertida em alto potencial de transferência de fosforila.

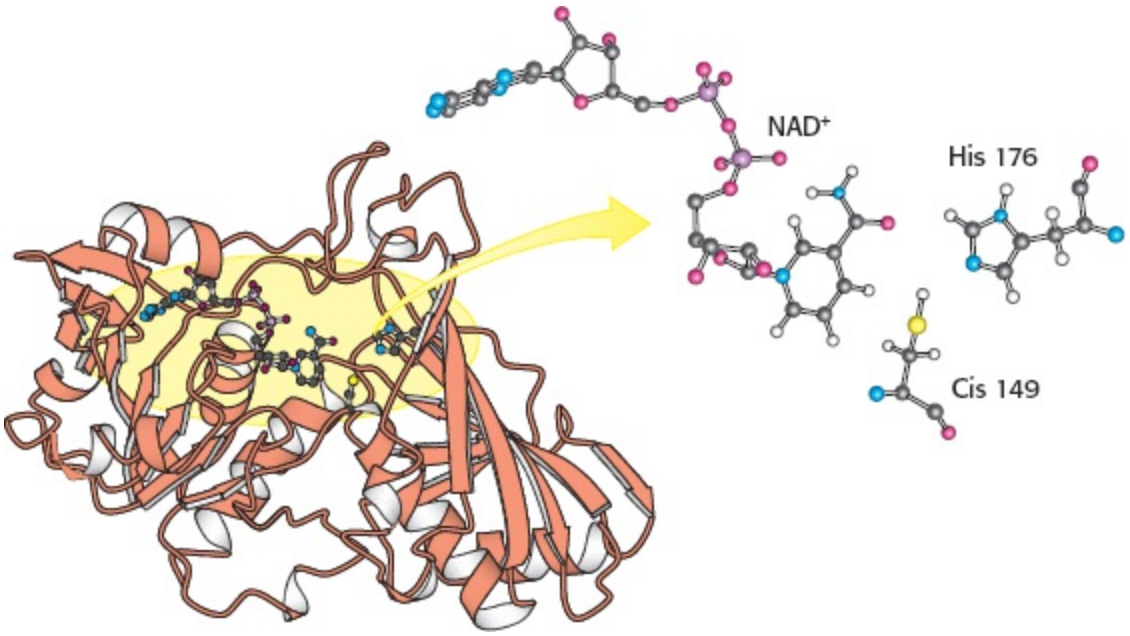


Figura 16.7 Estrutura da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. *Observe* que o sítio ativo inclui um resíduo de cisteína e um resíduo de histidina adjacentes a uma molécula de NAD^+ ligada à enzima. O átomo de enxofre da cisteína se unirá ao substrato para formar um intermediário tioéster transitório. [Desenhada a partir de 1GAD. Pdb.]

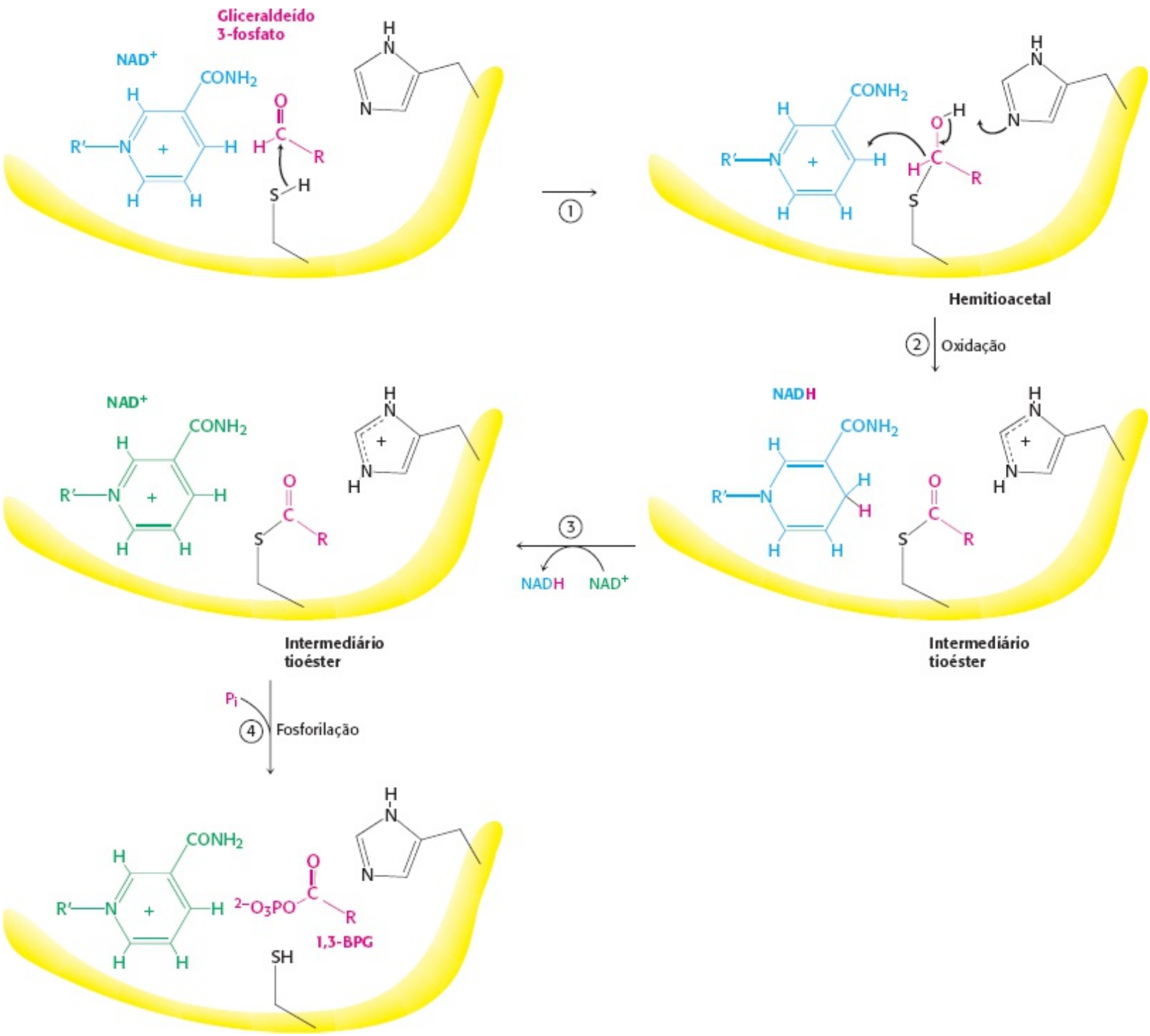
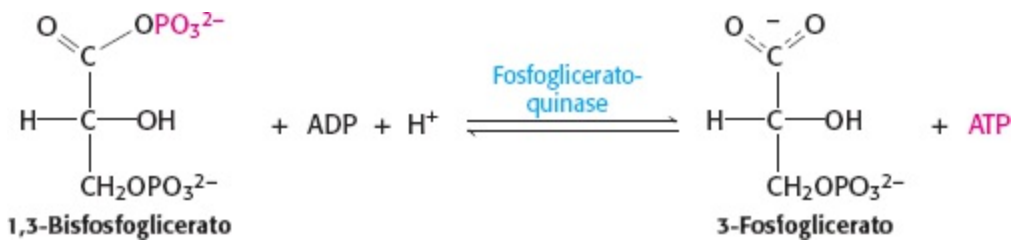


Figura 16.8 Mecanismo catalítico da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. A reação ocorre através de um intermediário tioéster, que permite que a oxidação do gliceraldeído seja acoplada à fosforilação do 3-fosfoglicerato. (1) A cisteína reage com o grupo aldeído do substrato, formando um hemitioacetal. (2) Ocorre uma oxidação com a transferência de um íon hidreto para o NAD^+, formando um tioéster. Esta reação é facilitada pela transferência de um próton à histidina. (3) O NADH reduzido é trocado por uma molécula de NAD^+. (4) O ortofosfato "ataca" o tioéster, formando o produto, 1,3BPG.

ATP é formado pela transferência de fosforila a partir do 1,3-bisfosfoglicerato

O 1,3-bisfosfoglicerato é uma molécula rica em energia com maior potencial de transferência de fosforila do que o ATP (Seção 15.2). Assim, 1,3-BPG pode ser utilizado para promover a síntese de ATP a parir de ADP. A *fosfogliceratoquinase* catalisa a transferência do grupo fosforila do acilfosfato do 1,3-bisfosfoglicerato para o ADP. ATP e 3-fosfoglicerato são os produtos.



A formação de ATP deste modo é chamada de *fosforilação ao nível do substrato*, porque o doador de fosfato, o 1,3-BPG, é um substrato com alto potencial de transferência de fosforila. Comparemos este modo de formação de ATP com a formação de ATP a partir de gradientes iônicos nos Capítulos 18 e 19.

Então, os desfechos das reações catalisadas pela gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e pela fosfogliceratoquinase são os seguintes:

1. O gliceraldeído 3-fosfato, um aldeído, é oxidado a 3-fosfoglicerato, um ácido carboxílico.

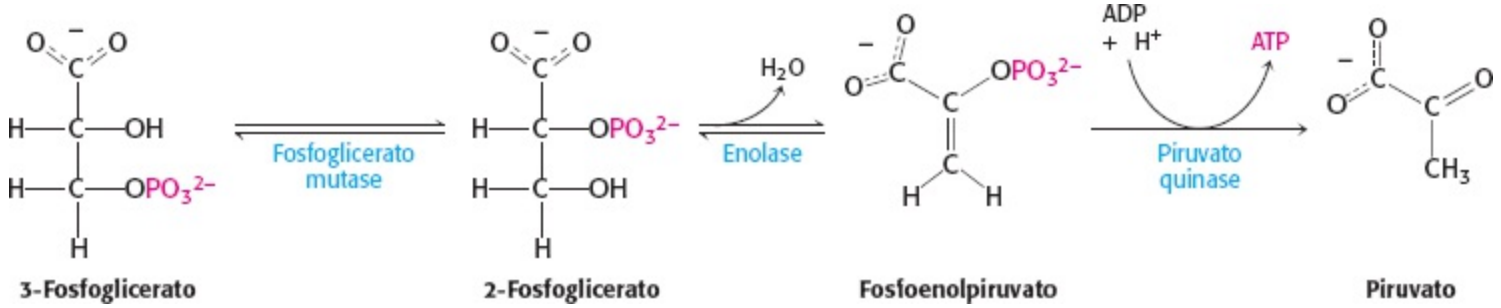
2. NAD^+ é, ao mesmo tempo, reduzido a NADH.

3. ATP é formado a partir de P_i e ADP à custa da energia de oxidação do carbono.

Em essência, a energia liberada durante a oxidação do gliceraldeído 3-fosfato a 3-fosfoglicerato é temporariamente retida na forma de 1,3-bisfosfoglicerato. Esta energia promove a transferência de um grupamento fosforila do 1,3-bisfosfoglicerato para o ADP, para produzir ATP. Tenha em mente que, devido às ações da aldolase e da triose fosfato isomerase, formaram-se duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato e, portanto, duas moléculas de ATP foram produzidas. Estas moléculas de ATP contrabalançam as duas moléculas de ATP consumidas no primeiro estágio da glicólise.

ATP adicional é produzido com a formação de piruvato

Nas etapas restantes da glicólise, 3-fosfoglicerato é convertido em piruvato e uma segunda molécula de ATP é formada a partir de ATP.



A primeira reação é um rearranjo. A posição do grupo fosforila muda na *conversão de 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato*, uma reação catalisada pela *fosfoglicerato mutase*. Em geral, uma *mutase* é uma enzima que catalisa o deslocamento intramolecular de um grupo químico, como um grupo fosforila. A reação da fosfoglicerato mutase tem um mecanismo interessante: o grupo fosforila não é simplesmente movido de um carbono para outro. Esta enzima demanda teores catalíticos de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG) para manter um resíduo de histidina do sítio ativo na

forma fosforilada. Este grupo fosforila é transferido para o 3-fosfoglicerato para formar novamente o 2,3-bisfosfoglicerato.

$$\text{Enz-His-fosfato} + \text{3-fosfoglicerato} \rightleftharpoons \text{Enz-His} + \text{2,3-bisfosfoglicerato}$$

A mutase, a seguir, atua como uma fosfatase: converte 2,3-bisfosfoglicerato em 2-fosfoglicerato. A mutase retém o grupo fosforila para regenerar a histidina modificada.

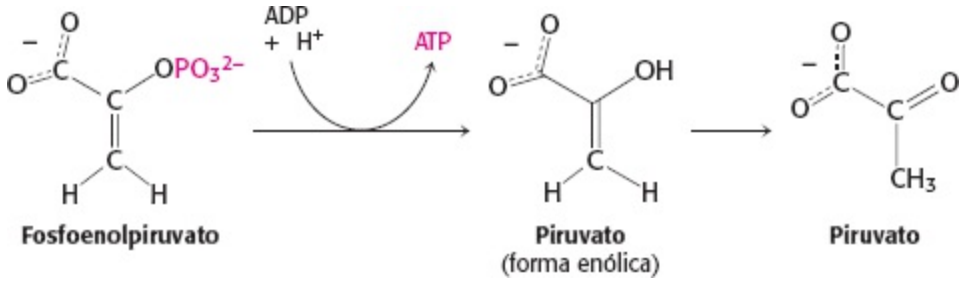
$$\text{Enz-His}^{+}\ \text{2,3-bisfosfoglicerato} \rightleftharpoons \text{Enz-His-fosfato} + \text{2-fosfoglicerato}$$

A soma destas reações origina a reação da mutase:

$$\text{3-Fosfoglicerato} \rightleftharpoons \text{2-fosfoglicerato}$$

Na reação seguinte, a desidratação do 2-fosfoglicerato introduz uma dupla ligação, formando um *enol*. A *enolase* catalisa a formação do enolfosfato *fosfoenolpiruvato* (PEP). Esta desidratação eleva substancialmente o potencial de transferência do grupo fosforila. Um *enolfosfato* tem um alto potencial de transferência de fosforila, enquanto o éster fosfato de um álcool comum, como o 2-fosfoglicerato, tem um baixo potencial. $\Delta G^{o'}$ da hidrólise de um éster fosfato de um álcool comum é –13 kJ mol^{-1} (–3 kcal mol^{-1}), enquanto a do fosfoenolpiruvato é –62 kJ mol^{-1} (–15 kcal mol^{-1}).

Por que o fosfoenolpiruvato tem este alto potencial de transferência de fosforila? O grupo fosforila mantém a molécula em sua forma enólica instável. Quando o grupamento fosforila for doado ao ATP, o enol será convertido a piruvato.



Portanto, *o alto potencial de transferência de fosforila do fosfoenolpiruvato surge basicamente da grande força impulsora da conversão subsequente enolcetona.* Forma-se piruvato, e ATP é simultaneamente produzido. A transferência praticamente irreversível de um grupo fosforila do fosfoenolpiruvato para o ADP é catalisada pela *piruvato quinase.* Qual é a fonte de energia para a formação de fosfoenolpiruvato? A resposta a esta pergunta torna-se clara quando comparamos as estruturas do 2-fosfoglicerato e do piruvato. A formação de piruvato a partir de 2-fosfoglicerato é, em essência, uma reação de oxirredução interna; o carbono 3 retira elétrons do carbono 2 na conversão de 2-fosfoglicerato a piruvato. Comparado com o 2-fosfoglicerato, C-3 é mais reduzido no piruvato, enquanto C-2 é mais oxidado. Mais uma vez, a oxidação do carbono promove a síntese de um composto com alto potencial de transferência de fosforila, aqui o fosfoenolpiruvato, e anteriormente o1,3-bisfosfoglicerato, o que permite a síntese de ATP.

Como as moléculas de ATP utilizadas para formar frutose 1,6-bisfosfato já foram regeneradas, as duas moléculas de ATP produzidas a partir do fosfoenolpiruvato são “lucro”.

São formadas duas moléculas de ATP na conversão de glicose em piruvato

A reação efetiva na transformação da glicose em piruvato é

$$\text{Glicose} + 2\ P_i + 2\ ADP + 2\ NAD^+ \rightarrow$$
$$2\ \text{piruvato} + 2\ ATP + 2\ NADH + 2\ H^+ + 2\ H_2O$$

Portanto, *são formadas duas moléculas de ATP na conversão de glicose em piruvato.* As reações de glicólise estão resumidas na Tabela 16.1.

A energia liberada na conversão anaeróbia da glicose em duas moléculas de piruvato é de aproximadamente –96 kJ mol^{-1} (–23 kcal mol^{-1}). Veremos nos Capítulos 17 e 18 que muito mais energia pode ser liberada a partir da glicose na presença de oxigênio.

Tabela 16.1 Reações da glicólise.

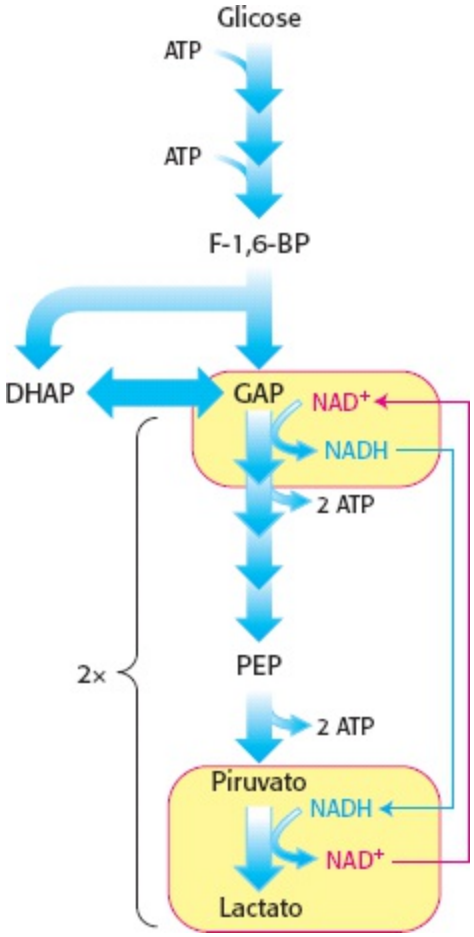
Etapa	Reação
1	Glicose + ATP → glicose 6-fosfato + ADP + H^+
2	Glicose 6-fosfato ⇌ frutose 6-fosfato
3	Frutose 6-fosfato + ATP → Frutose 1,6-bisfosfato + ADP + H^+
4	Frutose 1,6-bisfosfato ⇌ di-hidroxiacetona fosfato + gliceraldeído 3-fosfato
5	Di-hidroxiacetona fosfato ⇌ gliceraldeído 3-fosfato
6	Gliceraldeído 3-fosfato + P_i + NAD^+ ⇌ 1,3-bisfosfoglicerato + NADAH + H^+
7	1,3-Bisfosfoglicerato + ADP ⇌ 3-fosfoglicerato + ATP
8	3-Fosfoglicerato ⇌ 2-fosfoglicerato
9	2-Fosfoglicerato ⇌ fosfoenolpiruvato + H_2O
10	Fosfoenolpiruvato + ADP + H^+ → piruvato + ATP

Nota: ΔG, a variação real de energia livre, foi calculada a partir de $\Delta G^{o\prime}$ e das concentrações conhecidas dos reagentes em condições fisiológicas típicas. A glicólise só pode ocorrer se os valores de ΔG de todas as reações forem negativos. Os valores positivos pequenos de ΔG de três das reações acima indicam que as concentrações dos metabólitos in vivo nas células não são conhecidas com precisão.

NAD^+ é regenerado a partir do metabolismo do piruvato

A conversão de glicose em duas moléculas de piruvato resultou em síntese efetiva de ATP. Contudo, uma via conversora de energia que "para" no piruvato não pode ocorrer por muito tempo, porque o equilíbrio redox não é mantido. Como já vimos, a atividade da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, em adição à formação de um composto com alto potencial de transferência de fosforila, leva necessariamente à redução de NAD^+ em NADH. Na célula há quantidades limitadas de NAD^+, que deriva da vitamina niacina, uma necessidade alimentar para os seres humanos. Em consequência, para a glicólise ocorrer, NAD^+ tem de ser regenerado. Assim, o processo final da via é a regeneração de NAD^+ pelo metabolismo do piruvato.

A sequência de reações da glicose a piruvato é semelhante na maioria dos organismos e na maioria das células. Em contrapartida, o destino do piruvato é variável. Três reações do piruvato são de importância primordial: conversão em etanol, lactato ou dióxido de carbono (Figura 16.9). As duas primeiras reações são fermentações que ocorrem na ausência de oxigênio. *Fermentação* é um processo gerador de ATP no qual compostos orgânicos atuam como doador e como aceptor de elétrons. Na presença de oxigênio, o mais comum em organismos pluricelulares e em muitos unicelulares é que o piruvato seja metabolizado a dióxido de carbono e água pelo ciclo do ácido cítrico e pela cadeia de transporte de elétrons, com o oxigênio sendo o aceptor final de elétrons. Vejamos agora com mais detalhes esses três possíveis destinos do piruvato.



Regeneração do NAD+.

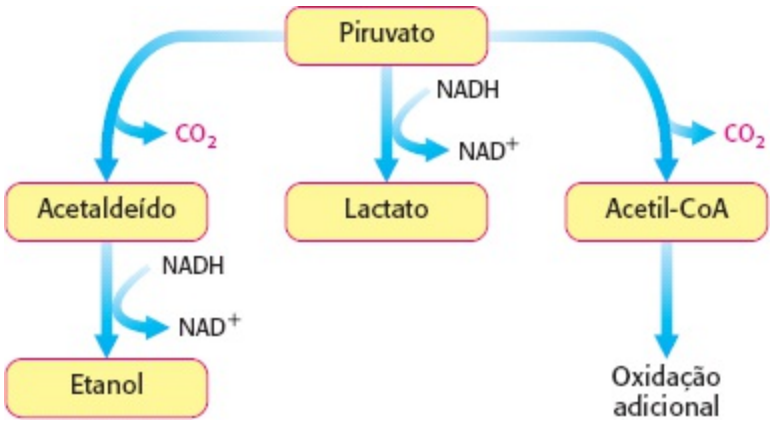
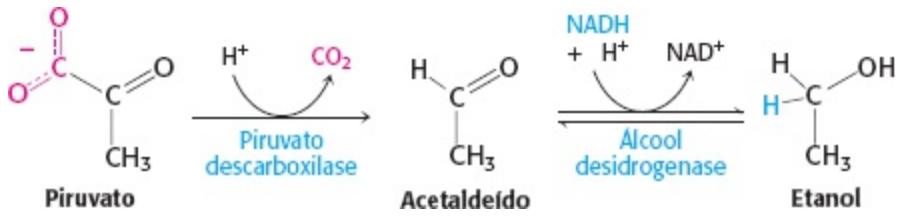


Figura 16.9 Diversos destinos do piruvato. Etanol e lactato podem ser formados por reações envolvendo NADH. Como alternativa, uma unidade de dois carbonos do piruvato pode ser acoplada à coenzima A (Capítulo 17) para formar acetil-CoA.

1. *Etanol* é formado a partir do piruvato em leveduras e em vários outros organismos. A etapa inicial é a descarboxilação do piruvato. Esta reação é catalisada *pela piruvato descarboxilase,* que requer a coenzima tiamina pirofosfato. Esta coenzima derivada da vitamina tiamina (B_1) também participa em reações catalisadas por outras enzimas (Seção 17.1). A segunda etapa é a redução do acetaldeído a etanol pelo NADH, em uma reação catalisada pela enzima *álcool desidrogenase*. Este processo regenera NAD^+.

Enzima	Tipo de reação	$\Delta G^{o\prime}$ em kJ mol^{-1} (kcal mol^{-1})	ΔG em kJ mol^{-1} (kcal mol^{-1})
Hexoquinase	Transferência de fosforila	−16,7 (−4,0)	−33,5 (−8,0)
Fosfoglicose isomerase	Isomerização	+1,7 (+0,4)	−2,5 (−0,6)
Fosfofrutoquinase	Transferência de fosforila	−14,2 (−3,4)	−22,2 (−5,3)
Aldolase	Clivagem aldólica	+23,8 (+5,7)	−1,3 (−0,3)
Triose fosfato isomerase	Isomerização	+7,5 (+1,8)	+2,5 (+0,6)
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	Fosforilação acoplada à oxidação	+6,3 (+1,5)	−1,7 (−0,4)
Fosfogliceratoquinase	Transferência de fosforila	−18,8 (−4,5)	+1,3 (+0,3)
Fosfoglicerato mutase	Mudança de posição da fosforila	+4,6 (+1,1)	+0,8 (+0,2)
Enolase	Desidratação	+1,7 (+0,4)	−3,3 (−0,8)
Piruvato quinase	Transferência de fosforila	−31,4 (−7,5)	−16,7 (−4,0)



O sítio ativo da enzima álcool desidrogenase contém um íon zinco que está coordenado aos átomos de enxofre de dois resíduos de cisteína e a um átomo de nitrogênio da histidina (Figura 16.10). Esse íon zinco polariza o grupo carbonila do substrato para favorecer a transferência de um hidreto do NADH.

A conversão da glicose em etanol é um exemplo de *fermentação alcoólica.* O resultado efetivo deste processo anaeróbico é

$$\text{Glicose} + 2P_i + 2\text{ADP} + 2\ H^+ \rightarrow 2\ \text{etanol} + 2CO_2 + 2\ \text{ATP} + 2\ H_2O$$

Observe que NAD^+ e NADH não aparecem nesta equação, apesar de serem fundamentais para o processo global. O NADH produzido pela oxidação do gliceraldeído 3-fosfato é consumido na redução do acetaldeído a etanol. Portanto, *não há oxirredução efetiva na conversão de glicose em*

etanol (Figura 16.11). O etanol formado na fermentação alcoólica fornece um ingrediente importante para fabricar cerveja e vinho.

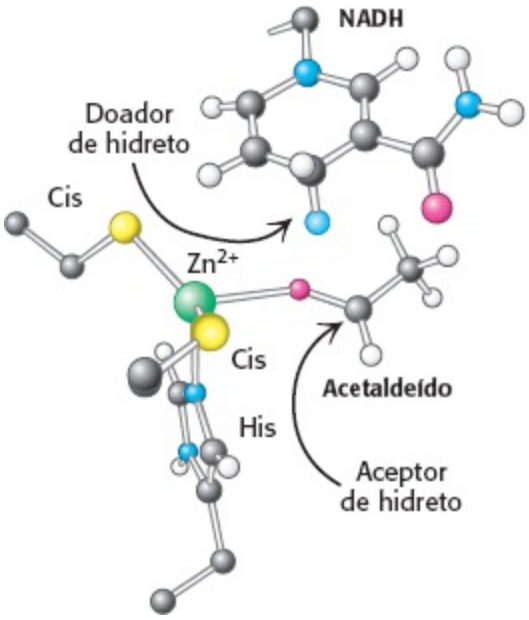


Figura 16.10 Sítio ativo da álcool desidrogenase. O sítio ativo contém um íon zinco ligado a dois resíduos de cisteína e um resíduo de histidina. *Observe* que o íon zinco liga-se ao substrato acetaldeído por seu átomo de oxigênio, polarizando o substrato, de modo que ele aceita mais facilmente um hidreto do NADH. Apenas o anel de nicotinamida do NADH é mostrado.

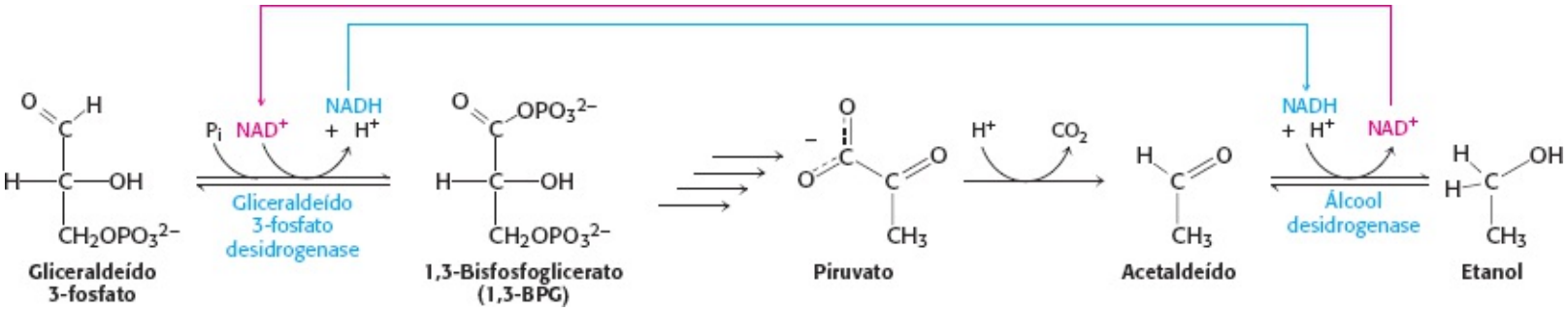
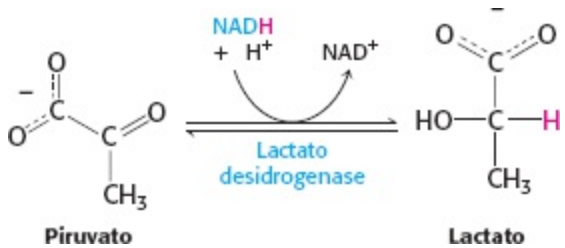


Figura 16.11 Manutenção do equilíbrio redox. O NADH produzido pela reação da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase tem de ser reoxidado a NAD^+ para que a via glicolítica prossiga. Na fermentação alcoólica, a álcool desidrogenase oxida o NADH e produz etanol. Na fermentação láctica (não exibida), a lactato desidrogenase oxida o NADH, durante a produção de ácido láctico.

2. *Lactato* é formado a partir do piruvato em inúmeros microrganismos em um processo denominado *fermentação láctica.* A reação também ocorre nas células de organismos superiores quando a quantidade de oxigênio é limitante, como nas células musculares durante atividade intensa. A redução do piruvato pelo NADH para formar lactato é catalisada pela *lactato desidrogenase.*



A reação global na conversão de glicose a lactato é

$$\text{Glicose} + 2\ P_i + 2\ ADP \rightarrow 2\ \text{lactato} + 2\ ATP + 2\ H_2O$$

Como na fermentação alcoólica, não há oxirredução efetiva. O NADH formado na oxidação do gliceraldeído 3-fosfato é consumido na redução do piruvato. *A regeneração de $NADH^+$ na redução do piruvato a lactato ou etanol mantém o processo de glicólise em condições anaeróbicas.*

3. Apenas uma fração da energia da glicose é liberada em sua conversão anaeróbica em etanol ou lactato. Muito mais energia pode ser extraída aerobicamente por meio do ciclo do ácido cítrico e da cadeia de transporte de elétrons. O ponto de entrada para esta via oxidativa é a *acetil coenzima A* (acetil-CoA), que se forma dentro das mitocôndrias pela descarboxilação oxidativa do piruvato,

$$\text{Piruvato} + NAD^+ + CoA \rightarrow \text{acetil-CoA} + CO_2 + NADH + H$$

Esta reação, que é catalisada pelo complexo piruvato desidrogenase, será abordada com detalhes no Capítulo 17. O NAD^+ necessário para esta reação e para a oxidação do gliceraldeído 3-fosfato é regenerado quando o NADH finalmente transfere seus elétrons ao O_2 na cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias.

As fermentações fornecem energia utilizável na ausência de oxigênio

As fermentações geram apenas uma fração da energia disponível a partir da oxidação completa da glicose. Por que uma via relativamente ineficiente é tão utilizada? O principal motivo é que ela não requer oxigênio. A capacidade de sobreviver sem oxigênio proporciona uma profusão de ambientes viáveis, tais como solo, águas profundas e poros da pele. Alguns organismos *ditos anaeróbicos obrigatórios* não conseguem sobreviver na presença de O_2, um composto muito reativo. A bactéria *Clostridium perfringens*, a causa da gangrena, é um exemplo de anaeróbico obrigatório. Outros anaeróbicos obrigatórios patogênicos estão listados na Tabela 16.2. Os músculos esqueléticos na maioria dos animais conseguem funcionar de modo anaeróbico por curtos períodos. Por exemplo, quando os animais executam períodos breves (salvas) de exercício intenso, suas necessidades de ATP sobem mais rápido do que a capacidade do organismo de fornecer oxigênio aos músculos. O músculo funciona de modo anaeróbico até que ocorra fadiga, que é causada, em parte, pelo acúmulo de lactato.

Tabela 16.2 Exemplos de anaeróbicos obrigatórios patogênicos.

Bactéria	Resultado da infecção
Clostridium tetani	Tétano
Clostridium botulinum	Botulismo (um tipo especialmente grave de envenenamento alimentar)
Clostridium perfringens	Gangrena gasosa (gás é produzido como um ponto final da fermentação, deformando e destruindo o tecido)
Bartonella henselae	Febre da arranhadura do gato (sinais e sintomas gripais)
Bacteroides fragilis	Infecções abdominal, pélvica, pulmonar e sanguínea

Tabela 16.3 Pontos de entrada e de saída de várias fermentações.

Glicose	→	lactato
Lactato	→	acetato
Glicose	→	etanol
Etanol	→	acetato
Arginina	→	dióxido de carbono
Pirimidinas	→	dióxido de carbono
Purinas	→	formato
Etilenoglicol	→	acetato
Treonina	→	propionato
Leucina	→	2-alquilacetato
Fenilalanina	→	propionato

Nota: Os produtos de algumas fermentações são os substratos para outras.

Embora tenhamos considerado apenas as fermentações láctica e alcoólica, os microrganismos são capazes de gerar uma ampla gama de moléculas como ponto final da fermentação (Tabela 16.3). De fato, muitos produtos alimentares, incluindo coalhada, iogurte, vários queijos, cerveja, vinho e chucrute, resultam da fermentação.

O sítio de ligação para o NAD^+ é semelhante em muitas desidrogenases

As três desidrogenases, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, álcool desidrogenase e lactato desidrogenase, têm estruturas tridimensionais bastante diferentes. Contudo, seus sítios de ligação ao NAD^+ são surpreendentemente semelhantes (Figura 16.12). Esta região de ligação ao nucleotídio é composta por quatro α-hélices e uma "lâmina" de seis folhas β paralelas. Além disso, em todos os casos, o NAD^+ ligado exibe quase a mesma conformação. Este domínio estrutural comum foi um dos primeiros domínios estruturais repetitivos a serem descobertos. Com frequência é denominado *Rossmann fold,* em homenagem a Michael Rossmann, que primeiro o reconheceu. Esta dobra provavelmente representa um domínio primordial de ligação de nucleotídio, que se repete nas desidrogenases da glicólise e em outras enzimas em virtude da sua origem em um ancestral comum.

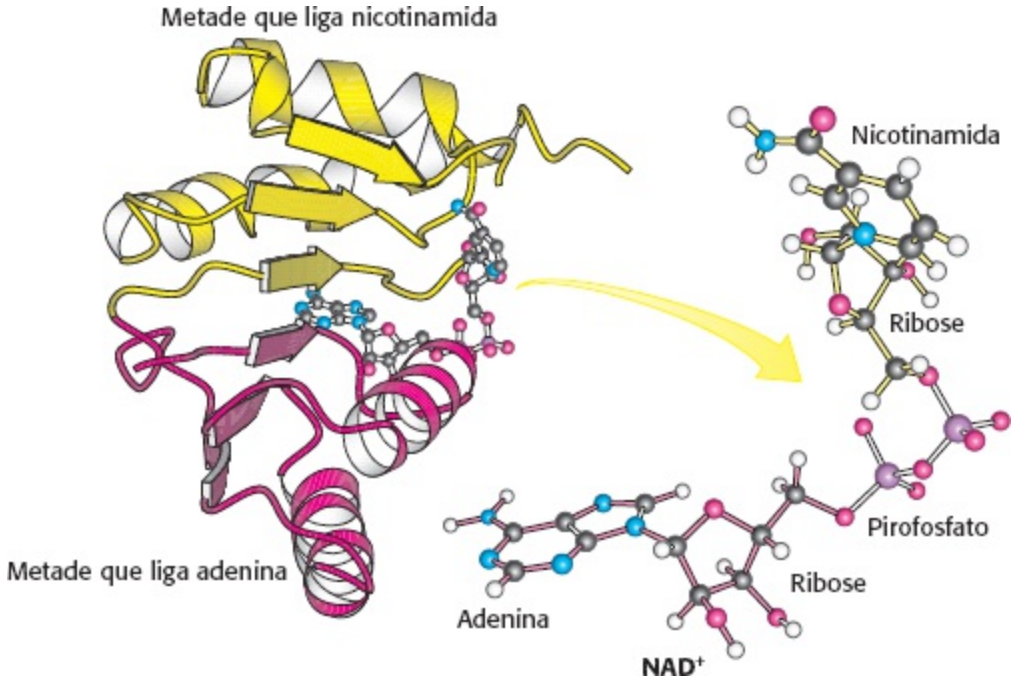


Figura 16.12 Região de ligação do NAD⁺ nas desidrogenases. *Observe* que a metade da ligação da nicotinamida (amarelo) é estruturalmente semelhante à metade da ligação da adenina (vermelho). As duas metades formam um *domínio* estrutural denominado *Rossmann fold*. A molécula de NAD⁺ liga-se em uma conformação distendida. [Reproduzida a partir de 3LDH.pdb.]

Frutose e galactose são convertidas em intermediários glicolíticos

Embora a glicose seja o monossacarídio mais utilizado, outros também são fontes importantes de energia. Consideremos como dois carboidratos abundantes, frutose e galactose, podem convergir para a via glicolítica (Figura 16.13). Não existem vias catabólicas para metabolizar frutose nem galactose, então, a estratégia é convertê-las em um metabólito da glicose.

A frutose pode seguir uma de duas vias para adentrar a via glicolítica. Boa parte da frutose ingerida é metabolizada pelo fígado, *utilizando a via da frutose 1-fosfato* (Figura 16.14). A primeira etapa é a fosforilação da frutose em *frutose 1-fosfato* pela *frutoquinase*. A frutose 1-fosfato é, a seguir, clivada em *gliceraldeído* e di-hidroxiacetona *fosfato*, um intermediário na glicólise. Esta clivagem aldólica é catalisada por uma *frutose 1-fosfato aldolase* específica. O gliceraldeído é, a seguir, fosforilado a *gliceraldeído 3-fosfato*, um intermediário glicolítico, pela *triose quinase*. Em outros tecidos, a *frutose pode ser fosforilada em frutose 6-fosfato pela hexoquinase.*

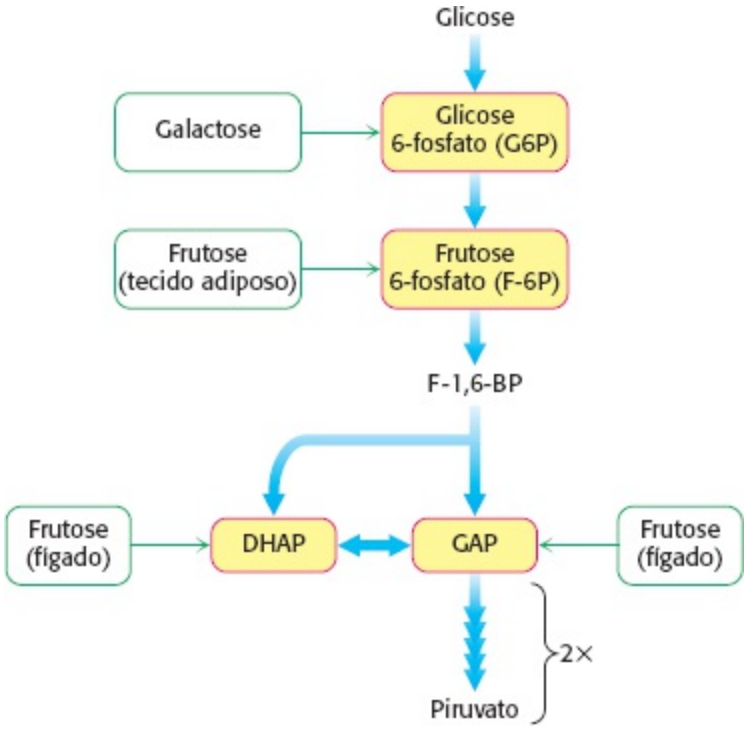


Figura 16.13 Pontos de entrada na glicólise para galactose e frutose.

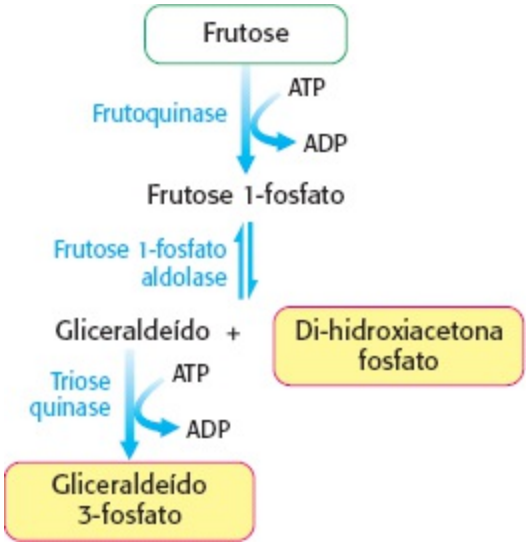
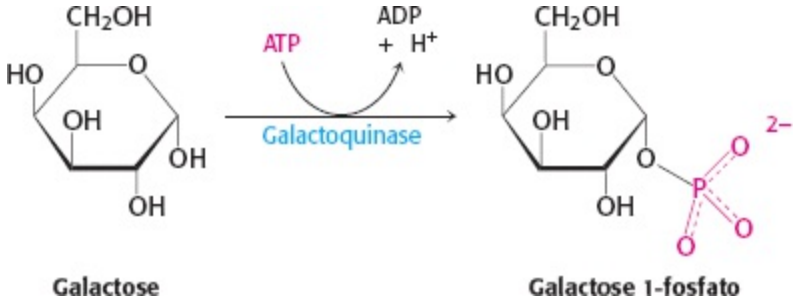


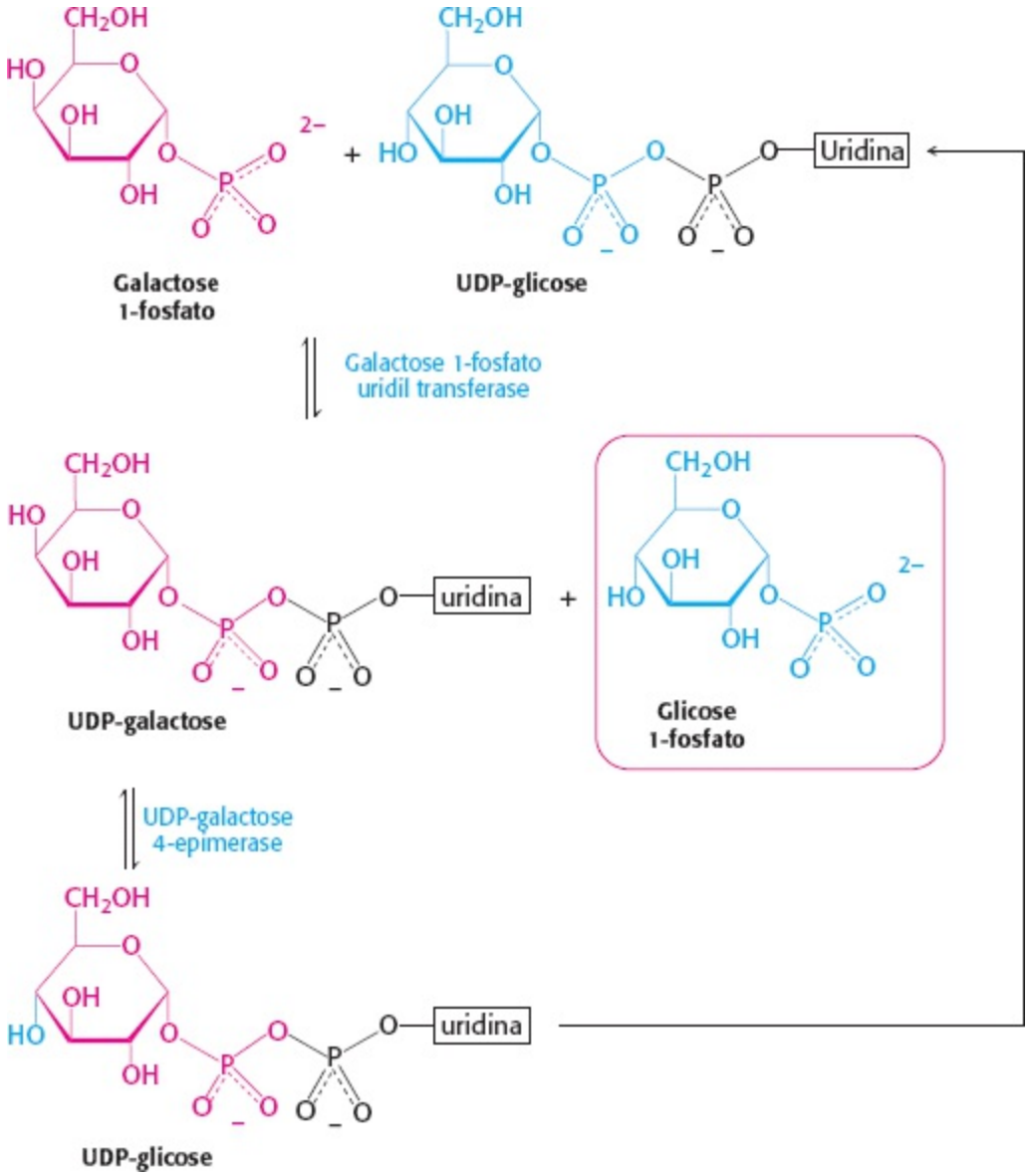
Figura 16.14 Metabolismo da frutose. A frutose entra na via glicolítica no fígado pela via da frutose 1-fosfato.

A galactose converte-se em *glicose 6-fosfato* em quatro etapas. A primeira reação na *via de interconversão galactose-glicose* é a fosforilação da galactose a galactose 1-fosfato pela *galactoquinase.*



A galactose 1-fosfato então adquire um grupamento uridila da uridina difosfato glicose (UDP-

glicose), um intermediário ativado na síntese de carboidratos (Seção 21.4).



Os produtos desta reação, que é catalisada pela *galactose 1-fosfato uridil transferase,* são UDP-galactose e glicose 1-fosfato. A galactose da UDP-galactose é, a seguir, epimerizada em glicose. A configuração do grupo hidroxila no carbono 4 é invertida pela *UDP-galactose 4-epimerase*.

A soma das reações catalisadas pela galactoquinase, pela transferase e pela epimerase é

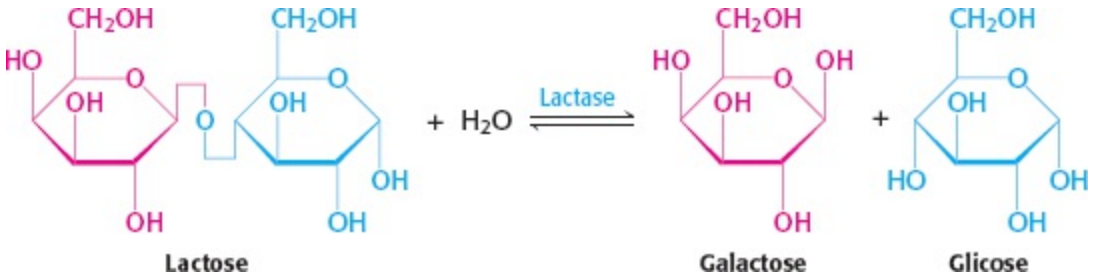
$$\text{Galactose} + \text{ATP} \rightarrow \text{glicose 1-fosfato} + \text{ADP} + \text{H}^+$$

Observe que a UDP-glicose não é consumida na conversão de galactose em glicose, porque é regenerada a partir da UDP-galactose pela epimerase. Esta reação é reversível e o produto do sentido oposto também é importante. *A conversão de UDP-glicose em UDP-galactose será essencial para a síntese de resíduos galactosila em polissacarídios complexos e glicoproteínas se o teor de galactose na alimentação for inadequado para suprir estas necessidades.*

Por fim, a glicose 1-fosfato, formada a partir da galactose, é isomerizada em glicose 6-fosfato pela *fosfoglicomutase*. Retornaremos a esta reação quando considerarmos a síntese e a degradação do glicogênio, que ocorre pela glicose 1-fosfato, no Capítulo 21.

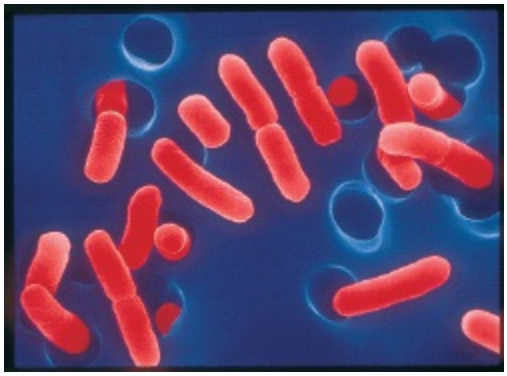
Muitos adultos são intolerantes ao leite porque têm deficiência de lactase

Muitos adultos não conseguem metabolizar a lactose (carboidrato do leite) e apresentam distúrbios gastrintestinais quando bebem leite. *Intolerância à lactose,* hipolactasia, é mais frequentemente causada por deficiência da enzima lactase, que cliva a lactose em glicose e galactose.



"Deficiência" não é exatamente o termo apropriado, pois uma diminuição de lactase é normal à medida que todos os mamíferos se desenvolvem. Quando as crianças são desmamadas e o leite se torna menos importante em suas dietas, a atividade da lactase normalmente diminui para cerca de 5 a 10% do nível por ocasião do nascimento. Esta diminuição não é tão pronunciada em algumas populações, sobretudo em pessoas oriundas do norte da Europa, que continuam a beber leite sem problemas gastrintestinais. Com o aparecimento de animais domésticos produtores de leite, um adulto com lactase ativa teria hipoteticamente uma vantagem seletiva ao ser capaz de consumir calorias do leite prontamente disponível. Como o gado leiteiro surgiu há apenas cerca de 10.000 anos, a pressão seletiva evolucionária sobre a persistência da lactase foi obrigatoriamente substancial, atestando o valor bioquímico da capacidade de utilização do leite como uma fonte energética na fase adulta.

O que acontece com a lactose no intestino de um indivíduo com deficiência em lactase? A lactose é uma boa fonte de energia para os microrganismos do cólon, e estes fermentam a lactose em ácido láctico, enquanto também geram metano (CH_4) e gás hidrogênio (H_2). O gás produzido provoca a desconfortável sensação de distensão abdominal e o problema irritante de flatulência. O lactato produzido pelos microrganismos é osmoticamente ativo e "puxa" água para o lúmen intestinal, como a lactose não digerida, resultando em diarreia. Se intensos o suficiente, o gás e a diarreia impedem a absorção de outros nutrientes, como lipídios e proteínas. O tratamento mais simples é evitar o consumo de produtos contendo muita lactose. Uma opção é usar formulações da enzima lactase ao consumir laticínios.



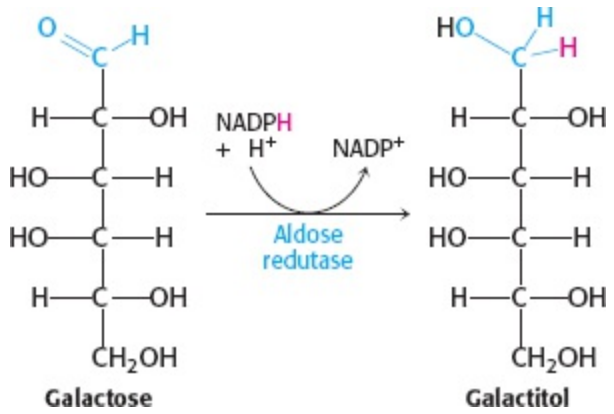
Micrografia eletrônica de varredura do *Lacto-bacillus.* A bactéria anaeróbia, *Lactobacillus*, é aqui exibida (colorida artificialmente) em um aumento de 22.245 ×. Como sugerido por seu nome, este gênero de bactérias fermenta a glicose a ácido láctico e é muito utilizado na indústria de alimentos. *Lactobacillus* é também um componente da flora normal humana do aparelho urogenital, onde, devido a sua capacidade de gerar um ambiente ácido, evita o crescimento de bactérias patogênicas. [Dr. Dennis Kunkel/PhotoTake.]

Galactose é muito tóxica se não houver transferase

Menos comuns do que a intolerância à lactose são os distúrbios que interferem no metabolismo da galactose. O distúrbio do metabolismo da glicose é denominado *galactosemia.* A forma mais comum, a galactosemia clássica, é uma deficiência hereditária na atividade da galactose 1-fosfato uridil transferase. As crianças atingidas apresentam retardo de crescimento. Vomitam ou apresentam diarreia após consumirem leite, e são comuns hepatomegalia e icterícia, às vezes progredindo para cirrose. A formação de catarata é uma complicação, e também são comuns letargia e retardo mental. O nível sanguíneo da galactose é muito elevado, e a galactose é encontrada na urina. A ausência da transferase nas hemácias é um critério definitivo de diagnóstico.

O tratamento mais comum é remover a galactose (e a lactose) da alimentação. Um enigma da galactosemia é que, embora a eliminação alimentar da galactose evite a doença hepática e o desenvolvimento de catarata, a maioria dos pacientes ainda sofre de disfunção do sistema nervoso central, mais frequentemente a aquisição retardada das habilidades de linguagem. As mulheres apresentam também insuficiência ovariana.

A formação da catarata é mais bem entendida. A catarata consiste em opacificação do cristalino, normalmente transparente (Figura 16.15). Se a transferase não for ativa no cristalino, a aldose redutase fará com que o acúmulo de galactose seja reduzida a galactitol.



O galactitol é osmoticamente ativo, e a água difundir-se-á para dentro do cristalino, provocando a formação da catarata. De fato, a incidência de formação de catarata com a idade é elevada nas populações que consomem muito leite na fase adulta.

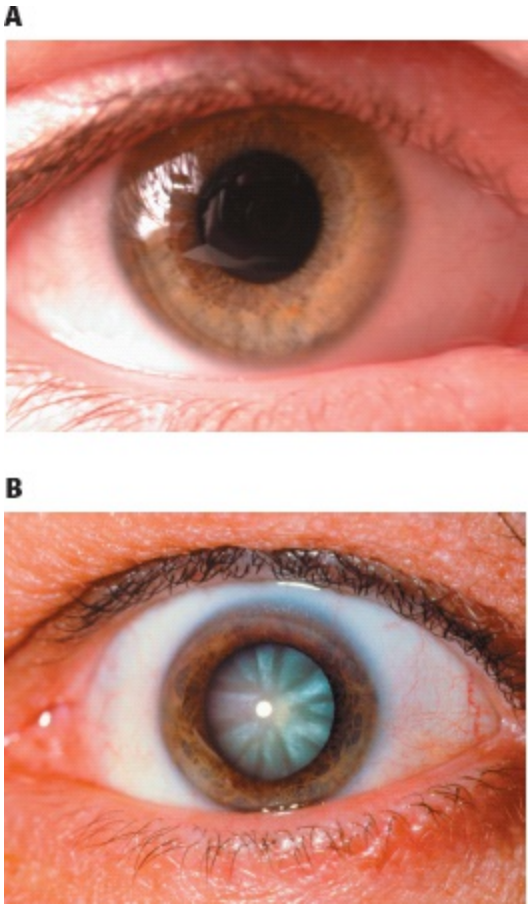


Figura 16.15 Cataratas são evidentes pela opacificação do cristalino. **A.** Um olho saudável. **B.** Um olho com catarata. [**A.** © Imageafter; **B.** SPL/Photo Researchers.]

16.2 A via glicolítica é rigidamente controlada

A via glicolítica tem dupla função: degrada glicose, para produzir ATP e unidades para as reações de síntese, como a formação de ácidos graxos. A velocidade de conversão da glicose em piruvato é regulada para satisfazer essas duas necessidades celulares importantes. *Nas vias metabólicas, as enzimas que catalisam as reações essencialmente irreversíveis são locais potenciais de controle.* Na glicólise, as reações catalisadas pela hexoquinase, pela fosfofrutoquinase e pela piruvato quinase são praticamente irreversíveis, portanto, essas enzimas devem desempenhar funções reguladoras, bem como catalíticas. De fato, cada uma delas serve como um local de controle. Essas enzimas tornam-se mais ou menos ativas em resposta à ligação reversível de efetores alostéricos ou de modificação covalente. Além disso, as concentrações destas enzimas importantes variam de acordo com a regulação da transcrição para suprir as variáveis necessidades metabólicas. O tempo necessário para o controle alostérico reversível, para a regulação por fosforilação e para o controle transcricional é tipicamente da ordem de milissegundos, segundos e horas, respectivamente. Abordaremos o controle da glicólise em dois tecidos diferentes, músculo esquelético e fígado.

A glicólise no músculo é regulada para atender às demandas de ATP

A glicólise no músculo esquelético fornece ATP basicamente para promover a contração. Em consequência, o controle primário da glicólise muscular é a carga energética da célula, a razão entre ATP e AMP. Examinemos como cada uma das importantes enzimas reguladoras responde a variações

nas concentrações celulares de ATP e de AMP.

Fosfofrutoquinase. *A fosfofrutoquinase é o local de controle mais importante na via glicolítica de mamíferos* (Figura 16.16). Altos níveis de ATP inibem alostericamente a enzima (um tetrâmero de 340 kDa). O ATP liga-se a um sítio regulatório específico distinto do sítio ativo. A ligação com o ATP abaixa a afinidade da enzima pela frutose 6-fosfato. Portanto, uma alta concentração de ATP converte a curva de ligação hiperbólica da frutose 6-fosfato em uma curva sigmoidal (Figura 16.17). AMP reverte a ação inibitória do ATP, de modo que *a atividade da enzima aumenta quando a razão ATP/AMP diminui.* Assim sendo, *a glicólise é estimulada quando cai a carga energética.* A queda do pH também inibe a atividade da fosfofrutoquinase por aumentar o efeito inibidor do ATP. O pH poderá cair quando o músculo está funcionando de modo anaeróbico, produzindo quantidades excessivas de ácido láctico. O efeito inibitório protege o músculo de lesão que resultaria do acúmulo de muito ácido láctico.

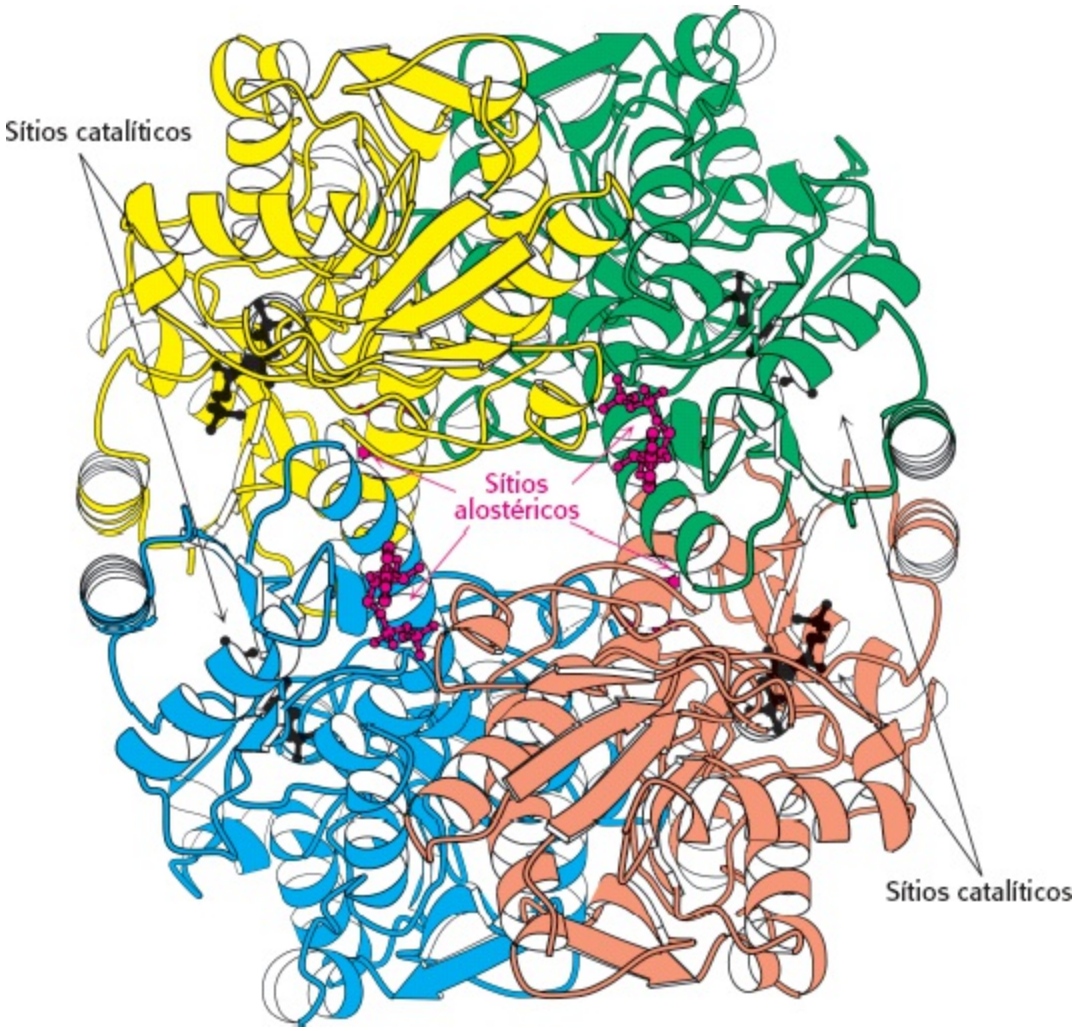


Figura 16.16 Estrutura da fosfofrutoquinase. A estrutura da fosfofrutoquinase da *E. coli* consiste em um tetrâmero de subunidades idênticas. *Observe* a separação dos sítios catalíticos e alostéricos. Cada subunidade da enzima hepática humana consiste em dois domínios que são semelhantes à enzima da *E. coli*. [Desenhada a partir de 1PFK.pdb.]

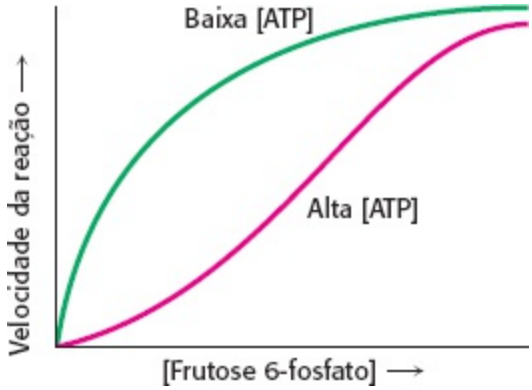


Figura 16.17 Regulação alostérica da fosfofrutoquinase. Um nível alto de ATP inibe a enzima por diminuir sua afinidade pela frutose 6-fosfato. AMP diminui e o citrato acentua o efeito inibitório do ATP.

Porque o AMP, e não o ADP, é o regulador positivo da fosfofrutoquinase? Quando o ATP está sendo rapidamente utilizado, a enzima *adenilatoquinase* (Seção 9.4) consegue formar ATP a partir do ADP, de acordo com a seguinte reação:

$$ADP + ADP \rightleftharpoons ATP + AMP$$

Portanto, algum ATP é recuperado do ADP e o AMP torna-se o sinal para o estado de baixa energia. Além disso, a utilização de AMP como regulador alostérico é um controle especialmente sensível. Podemos entender por que quando consideramos, inicialmente, que o *pool* total de adenilato ([ATP], [ADP], [AMP]) em uma célula é constante durante um curto período de tempo e, segundo, que a concentração de ATP é maior do que a de ADP e a concentração de ADP é, por sua vez, maior do que a de AMP. Em consequência, alterações de pequenas porcentagens na [ATP] resultam em alterações percentuais maiores na concentração de outros nucleotídios de adenilato. Essa amplificação de pequenas alterações da [ATP] para alterações maiores da [AMP] leva a um controle mais rígido por aumentar a faixa de sensibilidade da fosfofrutoquinase.

Hexoquinase. A fosfofrutoquinase é a enzima reguladora mais importante da glicólise, mas não é a única. A hexoquinase, a enzima que catalisa a primeira etapa da glicólise, é inibida pelo seu produto, a glicose 6-fosfato. Altas concentrações desta molécula sinalizam que a célula não necessita mais de glicose para fins energéticos nem para a síntese de glicogênio, uma forma de armazenamento de glicose (Capítulo 21) e a glicose será deixada no sangue. A elevação da concentração de glicose 6-fosfato é o meio pelo qual a fosfofrutoquinase comunica-se com a hexoquinase. Quando a fosfofrutoquinase está inativa, eleva-se a concentração de glicose 6-fosfato. Por sua vez, o nível de glicose 6-fosfato se eleva, porque está em equilíbrio com a frutose 6-fosfato. Portanto, *a inibição da fosfofrutoquinase leva à inibição da hexoquinase.*

Por que a fosfofrutoquinase, e não a hexoquinase, é o marca-passo da glicólise? O motivo torna-se evidente quando se observa que a glicose 6-fosfato não é só um intermediário glicolítico. Por exemplo, no músculo, a glicose 6-fosfato pode também ser convertida em glicogênio. A primeira reação irreversível específica da via glicolítica, a *etapa limitante* (Seção 10.1), é a fosforilação da frutose 6-fosfato em frutose 1,6-bisfosfato. Assim, é extremamente adequado que a fosfofrutoquinase seja o local de controle primário na glicólise. Em geral, *a enzima que catalisa a etapa limitante de uma sequência metabólica é o elemento mais importante de controle da via.*

Piruvato quinase. A piruvato quinase, a enzima que catalisa a terceira etapa irreversível da glicólise, controla a saída dessa via. Esta etapa final produz ATP e piruvato, um intermediário metabólico fundamental que pode ser oxidado ou utilizado como elemento estrutural. O ATP inibe alostericamente a piruvato quinase de modo a reduzir a velocidade da glicólise quando a carga energética for alta. Finalmente, a alanina (sintetizada em uma etapa a partir do piruvato, Seção 23.3) também inibe alostericamente a piruvato quinase, neste caso, para sinalizar que existem muitos elementos estruturais. Quando o ritmo da glicólise aumenta, a frutose 1,6-bisfosfato, o produto da etapa irreversível precedente da glicólise, ativa a quinase, capacitando-a a manter o ritmo com o elevado influxo de intermediários. Um resumo da regulação da glicólise no músculo em repouso e em atividade é exibido na Figura 16.18.

A regulação da glicólise no fígado ilustra a versatilidade bioquímica do órgão

O fígado tem funções bioquímicas mais diversas que o músculo. De modo significativo, o fígado mantém os níveis sanguíneos de glicose: armazena glicose como glicogênio quando a glicose é abundante e libera glicose quando o aporte é baixo. Ele também utiliza a glicose para gerar poder redutor para a biossíntese (Seção 20.3), bem como para sintetizar uma gama de compostos bioquímicos. Assim, embora o fígado apresente muito das características reguladoras da glicólise muscular, a regulação hepática desta via é mais complexa.

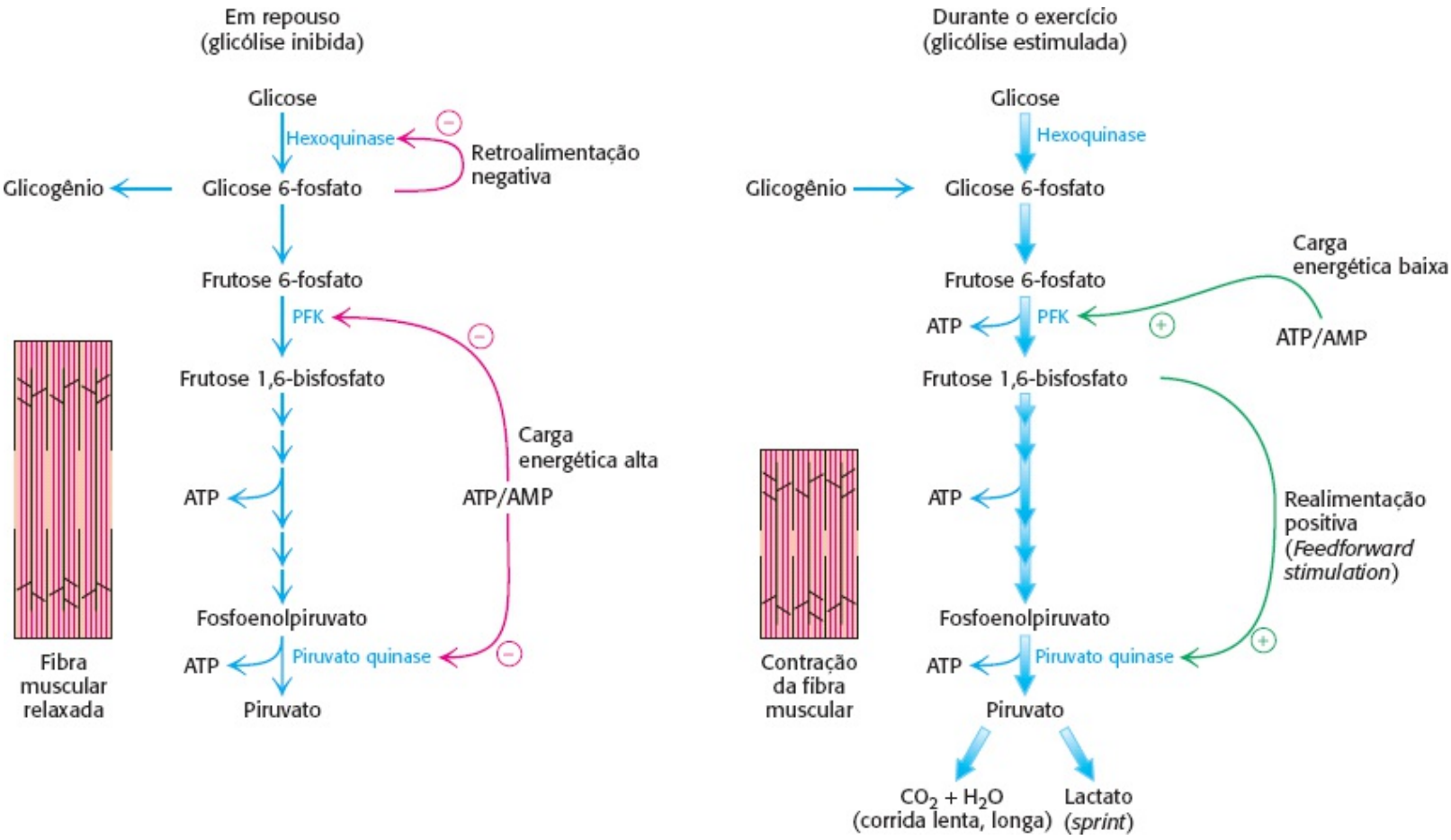


Figura 16.18 Regulação da glicólise no músculo. Em repouso (à esquerda), a glicólise não é muito ativa (setas finas). A alta concentração de ATP inibe a fosfofrutoquinase (PFK), a piruvato quinase e a hexoquinase. A glicose 6-fosfato é convertida em glicogênio (Capítulo 21). Durante o exercício (à direita), a razão diminuída de ATP/AMP resultante da contração muscular ativa a fosfofrutoquinase e, então, a glicólise. O fluxo ao longo da via é aumentado, como representado por setas grossas.

Fosfofrutoquinase. A regulação em relação ao ATP é a mesma no músculo e no fígado. Baixo pH não é um sinal metabólico para a enzima hepática, porque o lactato não é normalmente produzido pelo fígado. De fato, como veremos, o lactato é convertido no fígado em glicose.

A glicólise também fornece arcabouços de carbono para as biossínteses e, por isso, um sinal que indique se elementos estruturais são abundantes ou escassos também deve regular a fosfofrutoquinase. No fígado, *a fosfofrutoquinase é inibida por citrato,* um intermediário inicial do ciclo do ácido cítrico (Capítulo 17). Um alto nível de citrato no citoplasma significa que há muitos precursores biossintéticos e, por isso, não é necessário degradar mais glicose para este fim. O citrato inibe a fosfofrutoquinase ao ampliar o efeito inibidor do ATP.

A glicólise no fígado responde a variações nas concentrações sanguíneas de glicose por meio da molécula sinalizadora, a *frutose 2,6-bisfosfato* (F-2, 6BP), um ativador potente da fosfofrutoquinase (Figura 16.19). No fígado, a concentração de frutose 6-fosfato eleva-se quando a concentração sanguínea de glicose é alta e a fartura de frutose 6-fosfato acelera a síntese de F-2, 6-BP (Figura 16.20). Portanto, *a abundância de frutose 6-fosfato leva a uma maior concentração de F-2, 6-BP.* A ligação da frutose 2,6-bisfosfato aumenta a afinidade da fosfofrutoquinase pela frutose 6-fosfato e diminui o efeito inibidor do ATP. A glicólise é, assim, acelerada quando a glicose é farta. Este processo é conhecido como realimentação positiva (*feedforward stimulation*). Retornaremos à síntese e à degradação desta importante molécula reguladora depois de abordarmos a gliconeogênese.

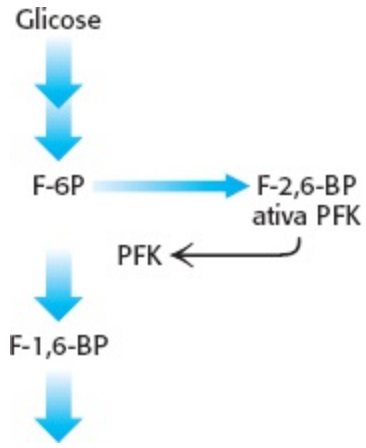


Figura 16.19 Regulação da fosfofrutoquinase pela frutose 2,6-bisfosfato. Em altas concentrações, a frutose 6-fosfato (F-6P) ativa a enzima fosfofrutoquinase (PFK) por meio de um intermediário, a frutose 2,6-bisfosfato (F-2, 6-BP).

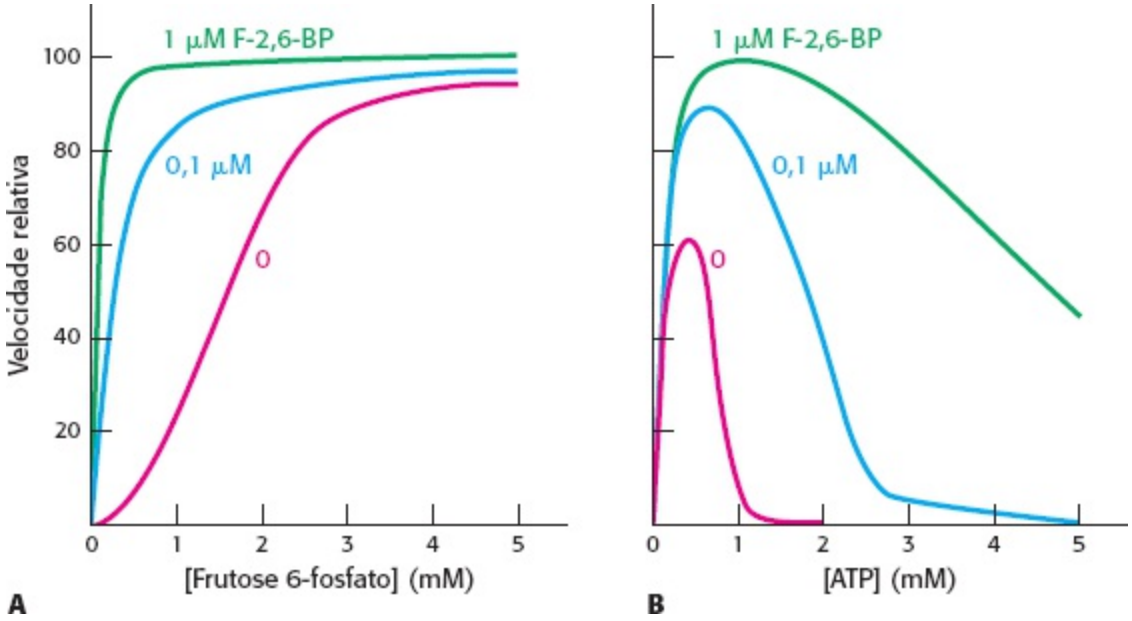


Figura 16.20 Ativação da fosfofrutoquinase pela frutose 2,6-bisfosfato. A. A dependência sigmoidal da velocidade sobre a concentração de substrato torna-se hiperbólica na presença de 1 μM de frutose 2,6-bisfosfato. **B.** ATP, atuando como substrato, inicialmente estimula a reação. À medida que aumenta a concentração de ATP, ele atua como um inibidor alostérico. O efeito inibidor do ATP é revertido pela frutose 2,6-bisfosfato. [De acordo com E. van Schaftingen, M. F. Jett, L. Hue e H. G. Hers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:3483-3486, 1981.]

Frutose 2,6-bisfosfato (F-2,6BP)

Hexoquinase. A reação da hexoquinase no fígado é controlada como no músculo. Contudo, o fígado, responsável pelo monitoramento dos níveis sanguíneos de glicose, possui outra isoenzima especializada da hexoquinase, denominada *glicoquinase,* que não é inibida pela glicose 6-fosfato. A glicoquinase fosforila a glicose apenas quando esta é abundante, porque a afinidade da glicose pela glicoquinase é cerca de 50 vezes menor do que a da hexoquinase. O papel da glicoquinase é fornecer glicose 6-fosfato para a síntese de glicogênio e para a formação de ácidos graxos (Seção 22.1). A baixa afinidade da glicoquinase pela glicose no fígado faz com que músculos e cérebro sejam os primeiros a receberem glicose quando o aporte for limitado e assegura que a glicose não será desperdiçada quando abundante. A glicoquinase também é encontrada nas células β pancreáticas, nas quais a formação aumentada de glicose 6-fosfato pela glicoquinase, quando os níveis sanguíneos de glicose estão elevados, provoca secreção do hormônio insulina. Esta sinaliza a necessidade de remoção de glicose do sangue para armazenamento como glicogênio ou para a conversão em gordura.

Piruvato quinase. Várias isoenzimas da piruvatoquinase (um tetrâmero de subunidades de 57 kDa) codificadas por diferentes genes são encontradas em mamíferos: o tipo L predomina no fígado e o tipo M, no músculo e no cérebro. As formas L e M da piruvato quinase compartilham muitas propriedades. De fato, a enzima hepática comporta-se de modo muito semelhante à forma muscular no tocante à regulação alostérica. Contudo, as isoenzimas diferem em suas suscetibilidades à modificação covalente. As propriedades catalíticas da forma L, mas não as da forma M, são também

controladas por fosforilação reversível (Figura 16.21). Quando o nível sanguíneo de glicose está baixo, a cascata de AMP cíclico disparada pelo glucagon (p. 491) leva à fosforilação da piruvato quinase, o que diminui a sua atividade. Esta fosforilação hormônio-deflagrada impede o fígado de consumir glicose quando esta é mais necessária para o cérebro e os músculos. Vemos aqui um exemplo claro de como as isoenzimas contribuem para a diversidade metabólica de diferentes órgãos. Retornaremos ao controle da glicólise após abordarmos a gliconeogênese.

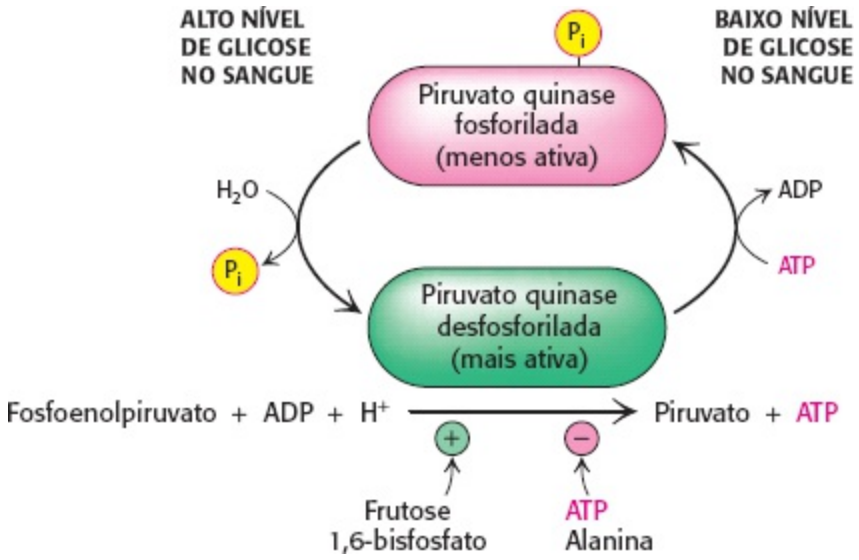


Figura 16.21 Controle da atividade catalítica da piruvato quinase. A piruvato quinase é regulada por efetores alostéricos e por modificação covalente.

Tabela 16.4 Família de transportadores de glicose.

Nome	Localização tecidual	K_M	Comentários
GLUT1	Todos os tecidos de mamíferos	1 mM	Captação basal de glicose
GLUT2	Fígado e células β pancreáticas	15 a 20 mM	No pâncreas, atua na regulação da insulina No fígado, remove o excesso de glicose do sangue
GLUT3	Todos os tecidos de mamíferos	1 mM	Captação basal de glicose
GLUT4	Celulas musculares e adipócitos	5 mM	Quantidade na membrana plasmática aumenta durante o treinamento de resistência
GLUT5	Intestino delgado	—	Basicamente um transportador de frutose

Uma família de transportadores possibilita a entrada e a saída de glicose das células animais

Vários transportadores de glicose medeiam o movimento termodinamicamente favorável da glicose através das membranas plasmáticas das células animais. Cada membro desta família de proteínas, denominadas GLUT 1 a GLUT5, é constituído por uma única cadeia polipeptídica com cerca de 500 resíduos de comprimento (Tabela 16.4). Cada transportador de glicose tem uma estrutura de 12 hélices transmembranares semelhante à da lactose permease (Seção 13.3).

Os membros desta família têm papéis distintos:

1. GLUT1 e GLUT3 presentes em quase todas as células de mamíferos, são responsáveis pela captação basal de glicose. Seu K_M para a glicose é de aproximadamente 1 mM, significativamente menor do que o nível sérico normal de glicose, que tipicamente varia de 4 a 8 mM. Assim sendo, GLU1 e GLUT3 transportam glicose continuamente para dentro das células em uma velocidade essencialmente constante.

2. GLUT2, presente no fígado e nas células β pancreáticas, é diferente por ter um K_M muito elevado para a glicose (15 a 20 mM). Por isso, a glicose penetra nestes tecidos com velocidade biologicamente significativa apenas quando há muita glicose no sangue. O pâncreas consegue detectar o nível de glicose e ajustar, de acordo com isso, a secreção de insulina. Um K_M alto do GLUT2 também assegura que a glicose penetre rapidamente nos hepatócitos apenas quando for abundante.

3. GLUT4, que tem um valor de K_M de 5 mM, transporta glicose para as células musculares e para os adipócitos. O número de transportadores GLUT4 na membrana citoplasmática aumenta rapidamente na presença de insulina, que sinaliza o estado de saciedade. Assim, a insulina promove a captação de glicose pelo músculo e pelo tecido adiposo. O treinamento de exercícios de resistência aumenta a quantidade desse transportador nas membranas musculares.

4. GLUT5, presente no intestino delgado, funciona basicamente como transportador de frutose.

Esta família de transportadores ilustra como isoformas de uma única proteína conseguem moldar profundamente o caráter metabólico das células e contribuir para sua diversidade e especialização funcional. Os transportadores são membros de uma superfamília de transportadores denominada família de facilitadores principais (MF). Os membros desta família transportam carboidratos em organismos tão diversos como *E. coli*, *Trypanosoma brucei* (um parasito protozoário que causa a doença do sono) e seres humanos. Uma boa solução para o problema de transporte de fontes de energia evoluiu precocemente e foi bem moldada para enfrentar as necessidades de diferentes organismos e até mesmo de diferentes tecidos.

Câncer e treinamento físico influenciam a glicólise de modo semelhante

Há décadas sabe-se que os tumores exibem velocidades aumentadas de captação de glicose e de glicólise. De fato, as células tumorais em crescimento rápido metabolizarão glicose a lactato mesmo na presença de oxigênio, um processo denominado glicólise aeróbica ou "efeito Warburg", em homenagem a Otto Warburg, o bioquímico que primeiro observou esta característica das células cancerosas nos anos 1920. De fato, os tumores com uma alta captação de glicose são particularmente agressivos e, provavelmente, sinal de um mau prognóstico. Um análogo não metabolizável da glicose, 2-^{18}F-2-D-desoxiglicose, detectável por uma combinação de tomografia por emissão de pósitrons (PET) e tomografia auxiliada por computação (CAT), facilmente visualiza os tumores (Figura 16.22).

Que vantagem seletiva tem a glicólise aeróbica do tumor sobre a fosforilação oxidativa mais

eficiente energeticamente? Ainda se busca ativamente a resposta a esta pergunta, mas podemos especular sobre os benefícios. Primeiro, a glicólise aeróbia produz lactato que é então secretado. A acidificação do ambiente tumoral facilita a invasão do tumor e inibe o sistema imune de atacar o tumor. Segundo, a captação aumentada de glicose e a formação de glicose 6-fosfato fornece substratos para outra via metabólica, a via da pentose fosfato (Capítulo 20), que gera poder redutor biossintético. Além disso, a via pentose fosfato, em cooperação com a glicólise, produz precursores de biomoléculas necessárias para o crescimento, como nucleotídios. Por fim, as células cancerosas crescem mais rapidamente do que os vasos sanguíneos que as nutrem; portanto, à medida que crescem os tumores sólidos, diminui a concentração de oxigênio em seu ambiente. Em outras palavras elas começam a sofrer de *hipoxia*, deficiência de oxigênio. O emprego da glicólise aeróbica reduz a dependência do oxigênio para o crescimento celular.

Figura 16.22 Tumores podem ser visualizados com 2-^{18}F-2-D-desoxiglicose (FDG) e tomografia por emissão de pósitrons. **A.** Um análogo não metabolizável da glicose infundido em um paciente e detectado por uma combinação de emissão de pósitrons e de tomografia auxiliada por computação revela um tumor maligno (T). **B.** Após 4 semanas de tratamento com um inibidor da tirosina quinase (Seção 14.5), o tumor não mostra captação de FDG, que indica metabolismo diminuído. O excesso de FDG, que é excretado na urina, também permite a visualização dos rins (K) e da bexiga (B). [Cortesia das imagens de A.D. Van den Abbeele, Dana-Farber Cancer Institute, Boston.]

A hipoxia por si própria aumenta o crescimento tumoral ao ativar um fator de transcrição, *fator de transcrição induzido por hipoxia* (HIF-1). O HIF-1 aumenta a expressão da maioria das enzimas glicolíticas e dos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT3 (Tabela 16.5). Estas adaptações apresentadas pelas células cancerosas permitem que o tumor sobreviva até o crescimento dos vasos sanguíneos. HIF-1 também aumenta a expressão das moléculas sinalizadoras, como o fator de

crescimento do endotélio vascular (VEGF), que facilita o crescimento dos vasos sanguíneos que fornecerão nutrientes às células (Figura 16.23). Sem novos vasos sanguíneos, um tumor pararia de crescer e morreria ou permaneceria inofensivamente pequeno. Esforços estão sendo concentrados para desenvolver fármacos que inibam o crescimento dos vasos sanguíneos dos tumores.

Que alterações bioquímicas facilitam a troca para glicólise aeróbica? Novamente as respostas não são completas, mas podem ser cruciais as alterações na expressão gênica de isoformas de duas enzimas glicolíticas. As células tumorais expressam uma isozima da hexoquinase que se liga às mitocôndrias. A enzima, nas mitocôndrias, acessa facilmente qualquer ATP gerado por fosforilação oxidativa e deixa de responder à inibição por retroalimentação pelo seu produto, a glicose 6-fosfato. Uma isozima embrionária da piruvato quinase também é expressada; ela facilita o uso de intermediários glicolíticos para reações de biossíntese e é sensível à regulação por fatores de crescimento.

Curiosamente, o treinamento de exercícios anaeróbicos ativa o HIF-1, promovendo os mesmos efeitos observados no tumor – capacidade aumentada de gerar ATP anaerobicamente e estímulo para o crescimento de vasos sanguíneos. Estes efeitos bioquímicos são responsáveis pela melhoria do desempenho atlético que resulta do treinamento e demonstra como o comportamento consegue influenciar a bioquímica.

Tabela 16.5 Proteínas do metabolismo da glicose codificadas por genes regulados pelo fator induzido por hipoxia.

GLUT1
GLUT3
Hexoquinase
Fosfofrutoquinase
Aldolase
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
Fosfogliceratoquinase
Enolase
Piruvato quinase

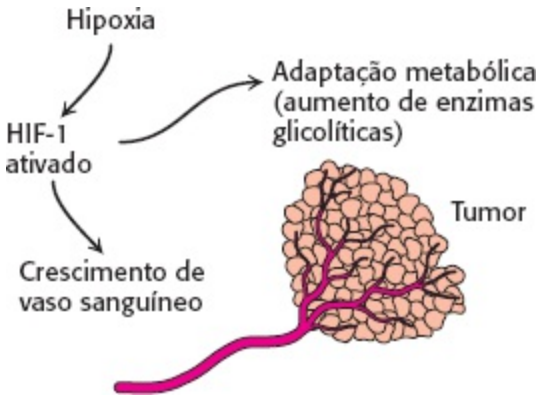


Figura 16.23 Alteração da expressão gênica em tumores devido à hipoxia. As condições de hipoxia intratumorais levam à ativação de um fator de transcrição induzido por hipoxia (HIF-1), que induz adaptação metabólica (aumento das enzimas glicolíticas) e ativa fatores angiogênicos que estimulam o crescimento de novos vasos sanguíneos. [Segundo C. V. Dang e G. L. Semenza. *Trends Biochem. Sci.* 24: 68-72, 1999.]

16.3 A glicose pode ser sintetizada a partir de precursores não carboidrato

Vejamos agora a *síntese de glicose a partir de precursores não carboidrato,* a chamada *gliconeogênese.* A manutenção dos níveis de glicose é importante, pois o cérebro depende da glicose como principal composto energético e as hemácias utilizam glicose como único composto energético. A necessidade diária de glicose do cérebro de um adulto humano típico é de aproximadamente 120 g, que representa a maior parte dos 160 g diários de glicose necessários para todo o organismo. A concentração de glicose nos fluidos corporais é de aproximadamente 20 g, e a que está prontamente disponível do glicogênio é cerca de 190 g. Portanto, as reservas diretas de glicose são suficientes para atender às necessidades de glicose por cerca de um dia. A gliconeogênese é especialmente importante durante um período maior de jejum ou de inanição (Seção 27.5).

A gliconeogênese converte piruvato em glicose. Os precursores não carboidrato da glicose são inicialmente transformados em piruvato ou entram na via na forma de intermediários, tais como oxaloacetato e di-hidroxiacetona fosfato (Figura 16.24). Os principais precursores não carboidratos são *lactato, aminoácidos e glicerol.* O lactato é formado pelo músculo esquelético ativo quando a velocidade da glicólise excede a do metabolismo oxidativo. O lactato é prontamente convertido em piruvato pela ação da lactato desidrogenase (p. 472). Os aminoácidos provêm da proteína alimentar e, durante a inanição, da degradação das proteínas dos músculos esqueléticos (Seção 23.1). A hidrólise de triacilgliceróis (Seção 22.2) nos adipócitos produz glicerol e ácidos graxos. O glicerol é um precursor de glicose, mas os animais não conseguem converter ácidos graxos em glicose, por motivos que serão apresentados mais adiante. O glicerol pode entrar na via da gliconeogênese ou da glicólise convertido em di-hidroxiacetona fosfato.

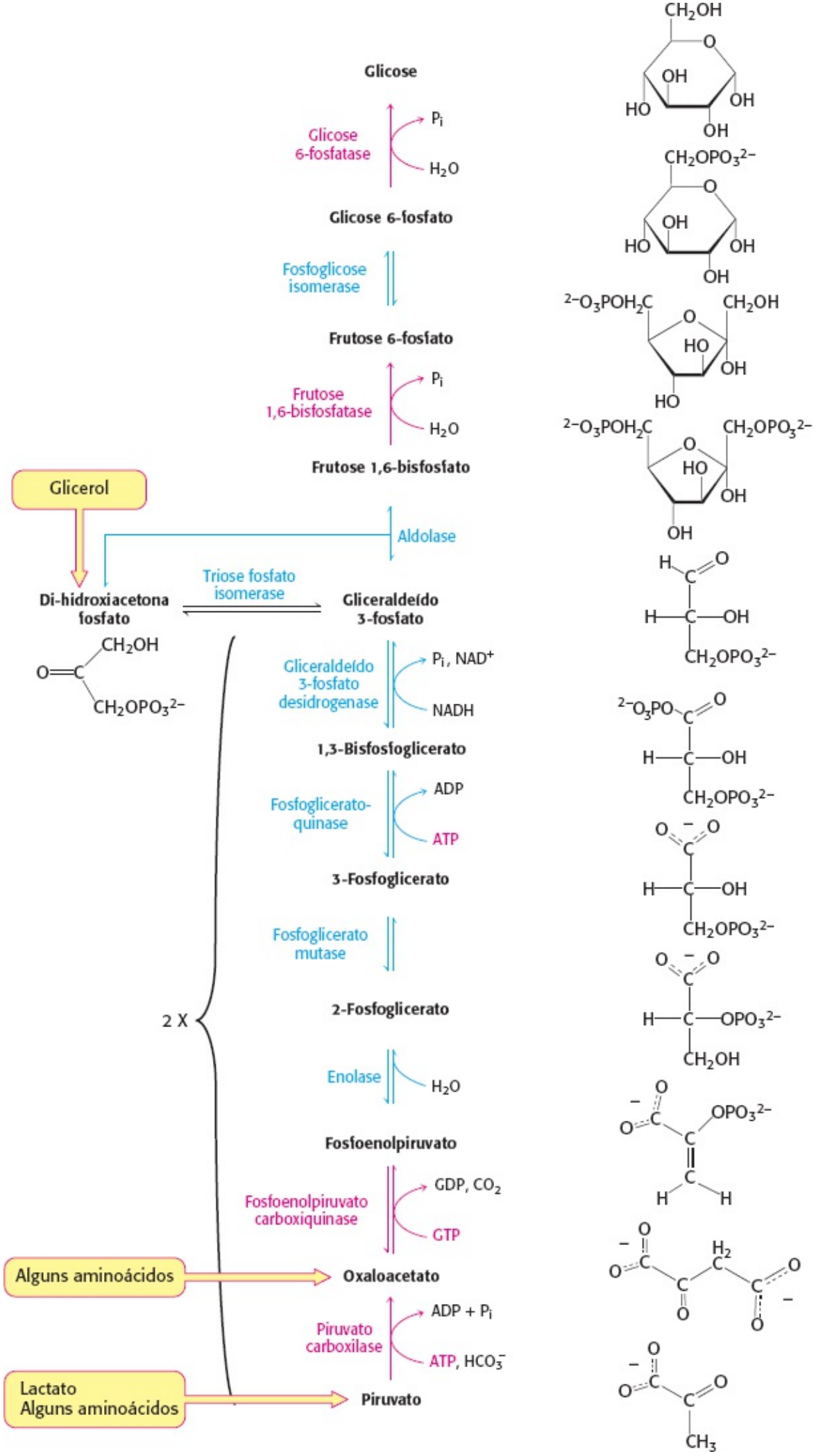
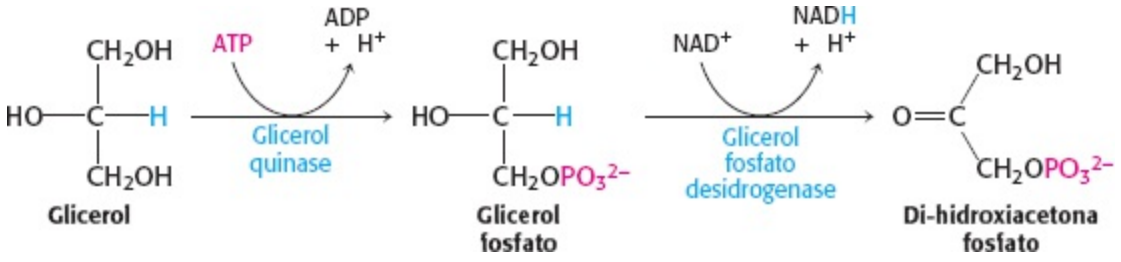

Glicose
Glicose 6-fosfatase
Pi
H2O
Glicose 6-fosfato
Fosfoglicose isomerase
Frutose 6-fosfato
Frutose 1,6-bisfosfatase
Pi
H2O
Frutose 1,6-bisfosfato
Glicerol
Aldolase
Triose fosfato isomerase
Di-hidroxiacetona fosfato
Gliceraldeído 3-fosfato
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
Pi, NAD+
NADH
1,3-Bisfosfoglicerato
Fosfoglicerato-quinase
ADP
ATP
3-Fosfoglicerato
Fosfoglicerato mutase
2-Fosfoglicerato
2 X
Enolase
H2O
Fosfoenolpiruvato
Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
GDP, CO2
GTP
Alguns aminoácidos
Oxaloacetato
Piruvato carboxilase
ADP + Pi
ATP, HCO3−
Lactato
Alguns aminoácidos
Piruvato

Figura 16.24 Gliconeogênese. As reações e as enzimas exclusivas desta via são mostradas em vermelho. As outras reações são comuns à glicólise. As enzimas da gliconeogênese localizam-se no citoplasma, exceto a piruvato carboxilase (nas mitocôndrias) e a glicose 6-fosfatase (nas membranas do retículo endoplasmático). São exibidos os pontos de entrada para lactato, glicerol e aminoácidos.



O principal local da gliconeogênese é o *fígado*, com um pequeno percentual também ocorrendo nos *rins*. Também ocorre alguma gliconeogênese no cérebro, nos músculos esqueléticos e no músculo cardíaco. Mais propriamente, *a gliconeogênese no fígado e nos rins ajuda a manter o nível sanguíneo de glicose de modo que o cérebro e os músculos consigam extrair glicose suficiente para atender às suas demandas metabólicas.*

Gliconeogênese não é o reverso da glicólise

Na glicólise, a glicose é convertida em piruvato; na gliconeogênese, piruvato é convertido em glicose. Contudo, a *gliconeogênese não é o reverso da glicólise.* Várias reações têm de ser diferentes, porque o equilíbrio termodinâmico da glicólise está mais para o lado da formação do piruvato. Para a formação de glicose a partir do piruvato ΔG real é de aproximadamente – 84 k kJ mol^{-1} (– 20 kcal mol^{-1}) em condições celulares típicas. A maior parte do decréscimo da energia livre da glicólise ocorre em três reações essencialmente irreversíveis, catalisadas pela hexoquinase, pela fosfofrutoquinase e pela piruvato quinase.

$$\text{Glicose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexoquinase}} \text{glicose 6-fosfato} + \text{ADP}$$
$$\Delta G = -33 \text{ kJ mol}^{-1} (-8{,}0 \text{ kcal mol}^{-1})$$

$$\text{Frutose 6-fosfato} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Fosfofrutoquinase}} \text{frutose 1,6-bisfosfato} + \text{ADP}$$
$$\Delta G = -22 \text{ kJ mol}^{-1} (-5{,}3 \text{ kcal mol}^{-1})$$

$$\text{Fosfoenolpiruvato} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{Piruvato quinase}} \text{piruvato} + \text{ATP}$$
$$\Delta G = -17 \text{ kJ mol}^{-1} (-4{,}0 \text{ kcal mol}^{-1})$$

Na gliconeogênese, as novas etapas seguintes contornam essas reações da glicólise praticamente irreversíveis:

1. *Fosfoenolpiruvato é formado a partir do piruvato via oxaloacetato* pela ação da piruvato carboxilase e da fosfoenolpiruvato carboxiquinase.

$$\text{Piruvato} + CO_2 + \text{ATP} + H_2O \xrightarrow{\text{Piruvato carboxilase}} \text{oxaloacetato} + \text{ADP} + P_i + 2\,H^+$$

$$\text{Oxaloacetato} + \text{GTP} \xrightarrow{\text{Fosfoenolpiruvato carboxiquinase}} \text{fosfoenolpiruvato} + \text{GDP} + CO_2$$

2. *A frutose 6-fosfato é formada a partir da frutose 1,6-bisfosfato pela hidrólise do éster de fosfato do carbono 1.* A frutose 1,6-bisfosfatase catalisa esta hidrólise exergônica.

$$\text{Frutose 1,6-bisfosfato} + H_2O \rightarrow \text{frutose 6-fosfato} + P_i$$

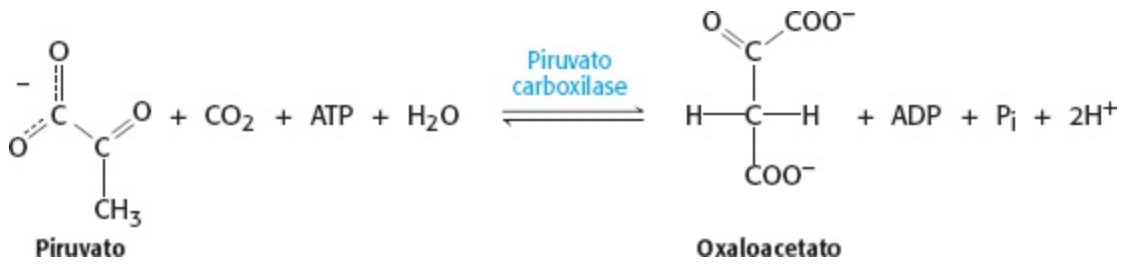
3. *A glicose é formada pela hidrólise da glicose 6-fosfato* em uma reação catalisada pela glicose 6-fosfatase.

$$\text{Glicose 6-fosfato} + H_2O \rightarrow \text{glicose} + P_i$$

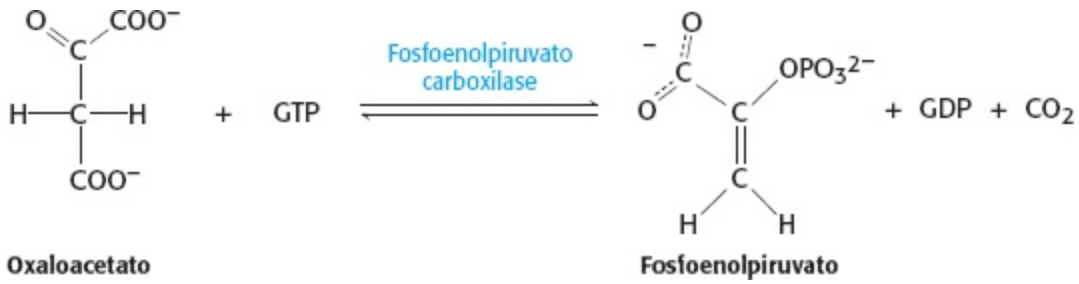
Examinaremos cada uma dessas etapas por vez.

A conversão de piruvato em fosfoenolpiruvato começa com a formação de oxaloacetato

A primeira etapa da gliconeogênese é a carboxilação do piruvato para formar oxaloacetato à custa de uma molécula de ATP.



A seguir, o oxaloacetato é descarboxilado e fosforilado para originar fosfoenolpiruvato à custa do alto potencial de transferência de fosforila do GTP.



A primeira dessas reações ocorre dentro das mitocôndrias.

A primeira reação é catalisada pela *piruvato carboxilase* e a segunda, pela *fosfoenolpiruvato carboxiquinase* (PEPCK). A soma destas reações é

$$\text{Piruvato} + \text{ATP} + \text{GTP} + H_2O \rightleftharpoons \text{fosfoenolpiruvato} + \text{ADP} + \text{GDP} + P_i + 2\,H^+$$

A piruvato carboxilase é de especial interesse por causa de suas propriedades estruturais, catalíticas e alostéricas. A extremidade N-terminal de 300 a 350 aminoácidos forma um *domínio de captura de*

ATP (Figura 16.25), que é um domínio de ativação de ATP encontrado em muitas enzimas, a ser abordado em maiores detalhes quando examinarmos a biossíntese de nucleotídios (Capítulo 25). A extremidade C-terminal de 80 aminoácidos constitui um domínio de ligação de biotina (Figura 16.26) que veremos novamente na síntese de ácidos graxos (Seção 22.4). A *biotina* é um grupo prostético ligado covalentemente, que funciona como *um carreador de CO_2 ativado.* O grupo carboxilato da biotina está ligado ao grupo ε-amino de um resíduo de lisina específico por uma ligação amida (Figura 16.27). Observe que a biotina se liga à piruvato carboxilase por uma *cadeia longa e flexível.*

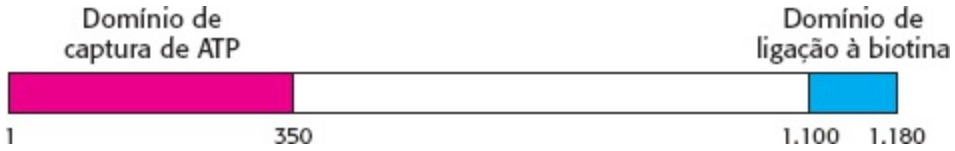


Figura 16.25 Estrutura de domínios da piruvato carboxilase. O domínio de captura de ATP ativa o HCO_3^- e transfere o CO_2 para o domínio de ligação da biotina. De lá, o CO_2 é transferido ao piruvato produzido no domínio central.

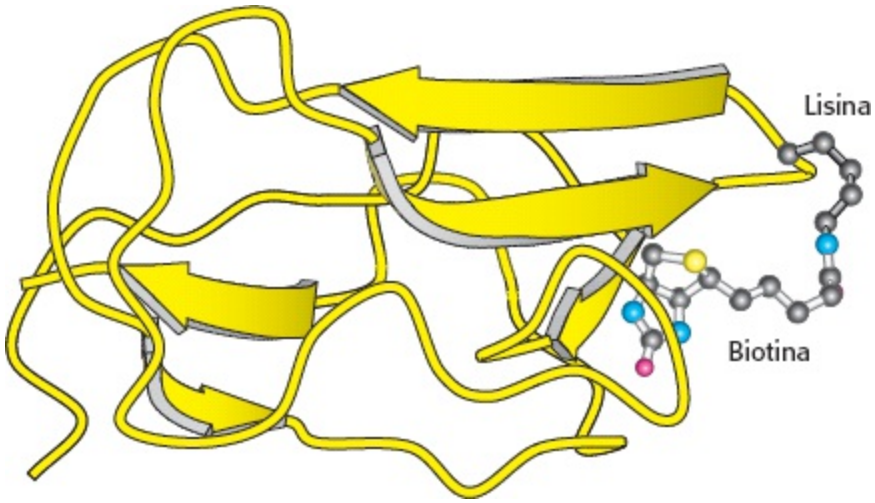


Figura 16.26 Domínio de ligação à biotina da piruvato carboxilase. Esta provável estrutura baseia-se na estrutura do domínio homólogo da enzima acetil-CoA carboxilase (Seção 22.4). *Observe* que a biotina está na ponta de um filamento flexível, o que a permite moverse entre o sítio de ATP-bicarbonato e o sítio do piruvato. [Desenhada a partir de 1BDO.pdb.]

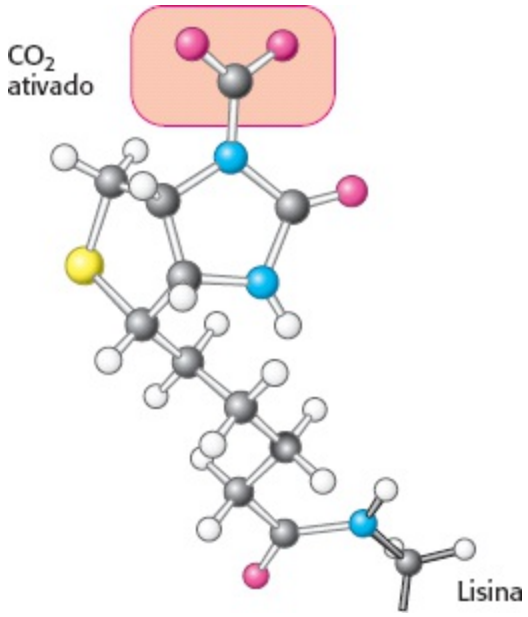


Figura 16.27 Estrutura da carboxibiotina.

A carboxilação do piruvato ocorre em três estágios:

$$HCO_3^- + ATP \rightleftharpoons HOCO_2\text{-}PO_3^{2-} + ADP$$

$$\text{Biotina-enzima} + HOCO_2\text{-}PO_3^{2-} \rightleftharpoons CO_2 - \text{biotina-enzima} + P_i$$

$$CO_2 - \text{biotina-enzima} + \text{piruvato} \rightleftharpoons \text{biotina-enzima} + \text{oxaloacetato}$$

Lembre-se de que, em soluções aquosas, CO_2 existe basicamente como HCO_3^- com a ajuda da anidrase carbônica (Seção 9.2). HCO_3^- é ativado a carboxifosfato. Este CO_2 ativado é a seguir ligado ao átomo N1 do anel da biotina para formar o intermediário carboxibiotina-enzima (Figura 16.27). O CO_2 unido à biotina está bastante ativado. Em que $\Delta G^{o'}$ desta clivagem

$$CO_2\text{-biotina-enzima} + H^+ \rightarrow CO_2 + \text{biotina-enzima}$$

é –20 kJ mol^{-1} (–4,7 kcal mol^{-1}). O valor negativo de $\Delta G^{o'}$ indica que a carboxibiotina é capaz de transferir o CO_2 para aceptores sem o aporte de energia livre adicional.

O grupo carboxila ativado é, a seguir, transferido da carboxibiotina para o piruvato, para formar oxaloacetato. A ligação longa e flexível entre a biotina e a enzima possibilita que este grupo prostético gire de um sítio ativo da enzima (o sítio ATP-bicarbonato) para o outro (o sítio do piruvato).

A primeira reação parcial da piruvato carboxilase, a formação de carboxibiotina, depende da presença de acetil-CoA. *A biotina não é carboxilada, a não ser que a acetil-CoA se ligue à enzima.* A acetil-CoA não exerce efeito sobre a segunda reação parcial. A ativação alostérica da piruvato carboxilase por acetil-CoA é um mecanismo de controle fisiologicamente importante que será abordado na Seção 17.4.

O oxaloacetato lançado ao citoplasma e convertido em fosfoenolpiruvato

A piruvato carboxilase é uma enzima mitocondrial, enquanto as outras enzimas da gliconeogênese são fundamentalmente citoplasmáticas. Oxaloacetato, o produto da reação da piruvato carboxilase, precisa, portanto, ser transportado para o citoplasma para completar a via. Ele é transportado da mitocôndria na forma de malato: oxaloacetato é reduzido a malato dentro da mitocôndria por uma malato desidrogenase ligada a NAD-H. Depois que o malato é transportado atravessando a membrana mitocondrial ele é reoxidado a oxalacetato por uma malato desidrogenase ligada a NAD^+ no citoplasma (Figura 16.28). A formação de oxaloacetato a partir de malato também fornece NADH para utilização nas etapas seguintes da gliconeogênese. Finalmente, o oxaloacetato é simultaneamente *descarboxilado* e *fosforilado* pela fosfoenolpiruvato carboxiquinase para produzir fosfoenolpiruvato. O doador de fosforila é GTP. O CO_2 que foi adicionado ao piruvato pela piruvato carboxilase sai nesta etapa.

Por que são necessárias uma carboxilação e uma descarboxilação para formar fosfoenolpiruvato a partir do piruvato? Lembre-se de que, na glicólise, a presença de um grupo fosforila "aprisiona" o isômero enólico instável do piruvato como fosfoenolpiruvato (p. 469). Contudo, o acréscimo de um grupo fosforila ao piruvato é uma reação muito desfavorável: O reverso da reação glicolítica catalisada pela piruvato quinase tem $\Delta G^{o'}$ de + 31 kJ mol^{-1} (+ 7,5 kcal mol^{-1}). Na gliconeogênese, o emprego de etapas de carboxilação e descarboxilação resulta em $\Delta G^{o'}$ muito mais favorável. A formação de fosfoenolpiruvato a partir de piruvato na gliconeogênese tem $\Delta G^{o'}$ de + 0,8 kJ mol^{-1} (+

0,2 kcal mol^{-1}). Uma molécula de ATP é utilizada para impulsionar o acréscimo de uma molécula de CO_2 ao piruvato na etapa de carboxilação. Esse CO_2 é, a seguir, removido para impulsionar a formação do fosfoenolpiruvato na reação de descarboxilação. *Muitas vezes descarboxilações impulsionam reações que, de outro modo, seriam extremamente endergônicas.* Este padrão metabólico é empregado no ciclo do acido cítrico (Capítulo 17), na via pentose fosfato (Capítulo 20) e na síntese de ácidos graxos (Seção 22.4).

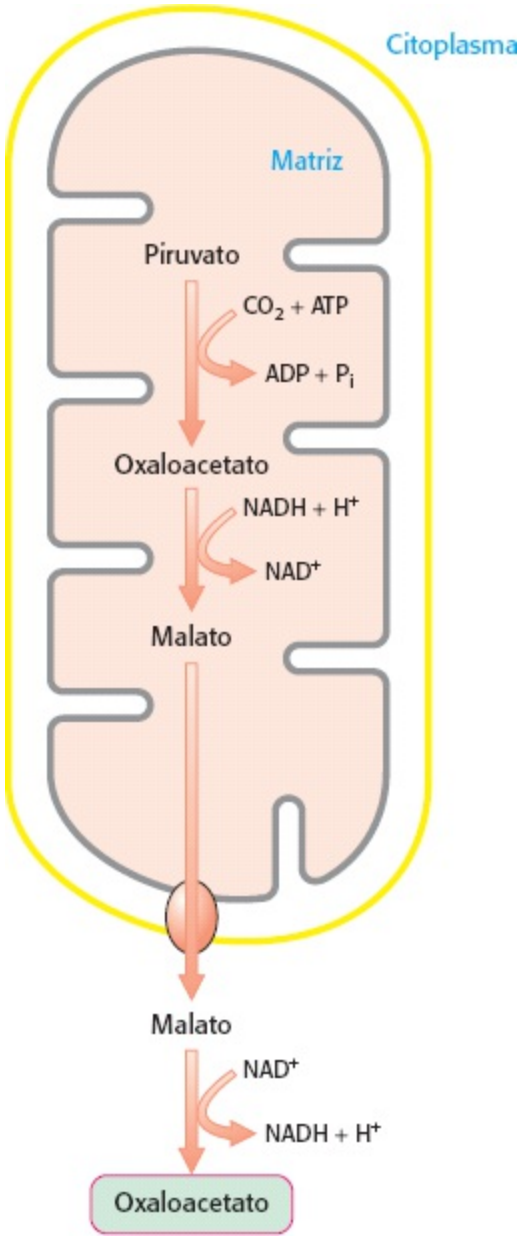


Figura 16.28 Cooperação compartimental. O oxaloacetato utilizado no citoplasma pela gliconeogênese é formado na matriz mitocondrial pela carboxilação do piruvato. O oxaloacetato deixa a mitocôndria por um sistema específico de transporte (não exibido) na forma de malato, que é reoxidado a oxaloacetato no citoplasma.

A conversão de frutose 1,6-bisfosfato em frutose 6-fosfato e ortofosfato é uma etapa irreversível

Uma vez formado, o fosfoenolpiruvato é metabolizado por enzimas da glicólise, mas no sentido reverso. Estas reações estão perto do equilíbrio em condições intracelulares; então, quando as condições favorecerem a gliconeogênese, as reações reversas ocorrerão até que seja alcançada a próxima etapa irreversível. Esta etapa é a hidrólise da frutose 1,6-bisfosfato a frutose 6-fosfato e P_i.

$$\text{Frutose 1,6-bisfosfato} + H_2O \xrightarrow{\text{Frutose 1,6-bisfosfatase}} \text{frutose 6-fosfato} + P_i$$

A enzima responsável por esta etapa é a frutose 1,6-bisfosfatase. Semelhante à sua equivalente glicolítica, ela é uma enzima alostérica que participa na regulação da gliconeogênese. Retornaremos a estas propriedades reguladoras mais adiante no capítulo.

A produção de glicose livre é um ponto de controle importante

A frutose 6-fosfato gerada pela frutose 1,6-bisfosfatase é prontamente convertida em glicose 6-fosfato. Na maioria dos tecidos, a gliconeogênese termina aqui. Glicose livre não é produzida, em vez disso, a glicose 6-fosfato é processada de outro modo, notadamente formando glicogênio. Uma vantagem de terminar a gliconeogênese em glicose 6-fosfato é que, diferente da glicose livre, a molécula não é transportada para fora da célula. Para manter a glicose dentro da célula, a produção de glicose livre é controlada de duas maneiras. Primeiro, a enzima responsável pela conversão de glicose 6-fosfato em glicose, a *glicose 6-fosfatase*, é regulada. Segundo, a enzima é encontrada somente em tecidos cuja obrigação metabólica é manter a homeostase da glicose sanguínea, tecidos que liberam glicose para o sangue. Estes tecidos são o fígado e, em menor grau, os rins.

Esta etapa final na produção de glicose não ocorre no citoplasma. Em vez disso, a glicose 6-fosfato é transportada para o lúmen do retículo endoplasmático, onde é hidrolisada em glicose pela glicose 6-fosfatase, que está ligada à membrana (Figura 16.29). Uma proteína estabilizadora de ligação do Ca^{2+} associada a ela é essencial para a atividade da fosfatase. Glicose e P_i são a seguir enviados de volta ao citoplasma por um par de transportadores. O transportador de glicose na membrana do retículo endoplasmático é igual ao encontrado na membrana plasmática. Destaca-se que são necessárias cinco proteínas para transformar glicose 6-fosfato em glicose.

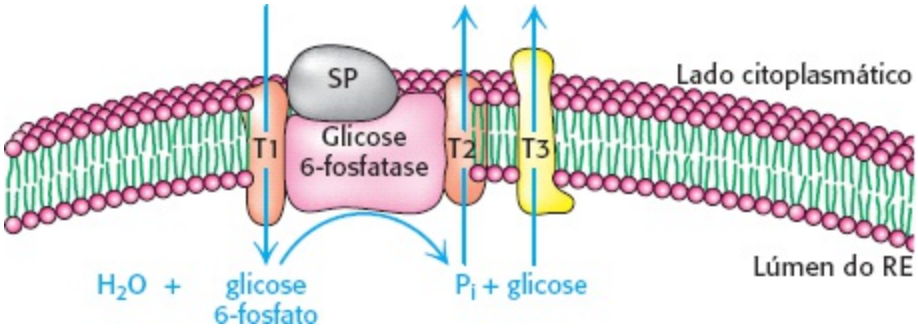


Figura 16.29 Produção de glicose a partir de glicose 6-fosfato. Várias proteínas do retículo endoplasmático (RE) participam na produção de glicose a partir da glicose 6-fosfato. T1 transporta glicose 6-fosfato para o lúmen do RE, enquanto T2 e T3 transportam P_i e glicose, respectivamente, de volta ao citoplasma. A glicose 6-fosfatase é estabilizada por uma proteína de ligação do Ca^{2+} (SP). [De acordo com A. Buchell e I. D. Waddel. *Biochem. Biophys. Acta* 1092:129-137 1991.]

Seis grupos de fosforila de alto potencial de transferência são gastos na síntese de glicose a partir de piruvato

A formação de glicose a partir de piruvato é energeticamente desfavorável, a não ser que seja acoplada a reações que sejam favoráveis. Compare a estequiometria da gliconeogênese com a do reverso da glicólise.

A estequiometria da gliconeogênese é

$$2\ \text{Piruvato} + 4\ \text{ATP} + 2\ \text{GTP} + 2\ \text{NADH} + 6\ H_2O \rightarrow \text{glicose} + 4\ \text{ADP} + 2\ \text{GDP} + 6\ P_i + 2\ NAD^+ + 2\ H^+$$

$$\Delta G^{o\prime} = -48\ \text{kJ mol}^{-1}\ (-11\ \text{kcal mol}^{-1})$$

Por outro lado, a estequiometria do reverso da glicólise

$$2\ \text{Piruvato} + 2\ \text{ATP} + \text{NADH} + 2\ H_2O \rightarrow \text{glicose} + 2\ \text{ADP} + 2\ P_i + 2\ NAD^+ + 2\ H^+$$

$$\Delta G^{o\prime} = +84\ \text{kJ mol}^{-1}\ (+20\ \text{kcal mol}^{-1})$$

Observe que *seis* moléculas de nucleosídios trifosfato são hidrolisadas para sintetizar glicose a partir de piruvato na gliconeogênese, enquanto apenas duas moléculas de ATP são produzidas na glicólise na conversão de glicose em piruvato. Portanto, o "custo" extra da gliconeogênese é de quatro moléculas de alto potencial de fosforila para cada molécula de glicose sintetizada a partir de piruvato. As quatro moléculas adicionais com alto potencial de transferência de fosforila são necessárias para transformar um processo energeticamente desfavorável (a reversão da glicólise) em um favorável (gliconeogênese). Aqui temos um claro exemplo do acoplamento de reações; a hidrólise de NTP é utilizada para impulsionar uma reação energeticamente desfavorável, as reações da gliconeogênese estão resumidas na Tabela 16.6.

Tabela 16.6 Reações da gliconeogênese.

Etapa	Reação
1	Piruvato + CO_2 + ATP + H_2O → oxaloacetato + ADP + P_i + 2H+
2	Oxaloacetato + GTP ⇌ fosfoenolpiruvato + GDP + CO_2
3	Fosfoenolpiruvato + H_2O ⇌ 2-fosfoglicerato
4	2-Fosfoglicerato ⇌ 3-fosfoglicerato
5	3-Fosfoenolpiruvato + ATP ⇌ 1,3-bisfosfoglicerato + ADP
6	1,3-Bisfosfoglicerato + NADH + H+ ⇌ gliceraldeído 3-fosfato + NAD+ + P_i
7	Gliceraldeído 3-fosfato ⇌ di-hidroxiacetona fosfato
8	Gliceraldeído 3-fosfato + di-hidroxiacetona fosfato ⇌ frutose 1,6-bisfosfato
9	Frutose 1,6-bisfosfato + H_2O → frutose 6-fosfato + P_i
10	Frutose 6-fosfato ⇌ glicose 6-fosfato
11	Glicose 6-fosfato + H_2O ⇌ + glicose + P_i

16.4 A gliconeogênese e a glicólise são reguladas reciprocamente

A gliconeogênese e a glicólise são coordenadas de modo que, dentro de uma célula, uma via esteja relativamente inativa quando a outra está em alta atividade. Se ambos os conjuntos de reações estivessem muito ativos ao mesmo tempo, o resultado efetivo seria a hidrólise de quatro nucleosídios trifosfato (duas moléculas de ATP mais duas moléculas de GTP) por ciclo de reação. Tanto a glicólise quanto a gliconeogênese são muito exergônicas nas condições celulares e, assim, não há barreira termodinâmica para tal atividade simultânea. Contudo, os *teores* e as *atividades* das enzimas diferentes de cada via são controlados, de modo que ambas as vias não são muito ativas ao mesmo tempo. A velocidade da glicólise também é determinada pela concentração de glicose, e a da gliconeogênese, pela concentração de lactato e de outros precursores de glicose. A premissa básica da regulação inversa é que, quando a energia é necessária, a glicólise predomina. Quando há excesso de energia, prevalece a gliconeogênese.

A carga energética determina se a glicólise ou a gliconeogênese serão as mais ativas

O primeiro ponto importante de regulação é a interconversão de frutose 6-fosfato em frutose 1,6-bisfosfato (Figura 16.30). Considere inicialmente uma situação na qual é necessária energia. Neste caso, a concentração de AMP é alta. Nestas condições, AMP estimula a fosfofruto quinase, mas inibe a frutose 1,6-bisfosfatase. Portanto, a glicólise é ativada e a gliconeogênese inibida. Por outro lado, altos níveis de ATP e de citrato indicam que a carga energética é alta e que os intermediários biossintéticos são fartos. ATP e citrato inibem a fosfofrutoquinase, enquanto o citrato ativa a frutose 1,6-bisfosfatase. Nestas condições a glicólise é quase que interrompida e a gliconeogênese é favorecida. Por que o citrato toma parte neste esquema de regulação? Como veremos no Capítulo 17, o citrato descreve o estado do ciclo do ácido cítrico, a via principal para a oxidação de compostos energéticos na presença de oxigênio. Altos níveis de citrato indicam uma situação rica em energia e a existência de precursores para biossínteses.

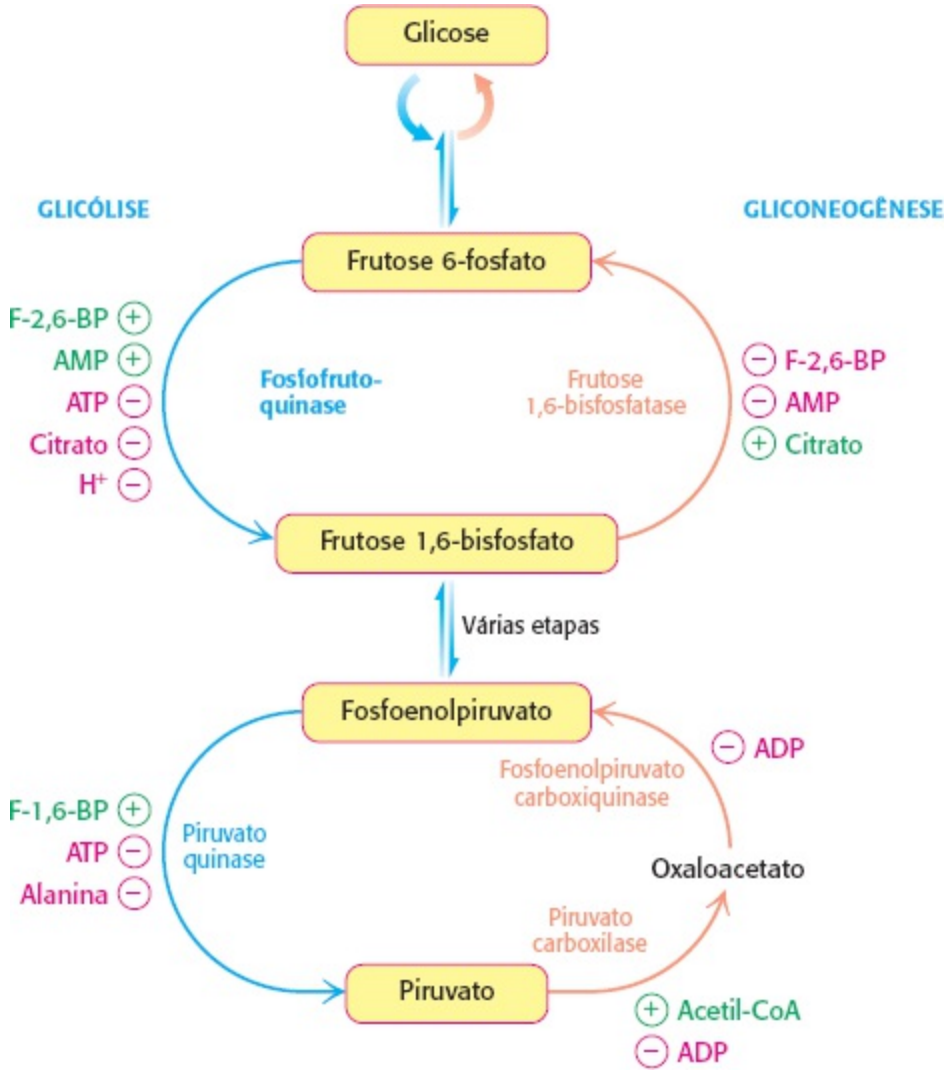


Figura 16.30 Regulação recíproca da gliconeogênese e da glicólise no fígado. O nível de frutose 2,6-bisfosfato é alto no estado de saciedade e baixo no jejum. Outro controle importante é a inibição da piruvato quinase por meio de fosforilação durante o jejum.

A glicólise e a gliconeogênese também são reciprocamente reguladas na interconversão do fosfoenolpiruvato e piruvato no fígado. A enzima glicolítica, piruvatoquinase, é inibida por efetores alostéricos ATP e alanina, que sinalizam que a carga energética é alta e que os elementos estruturais são abundantes. Em contrapartida, a piruvato carboxilase, que catalisa a etapa inicial da gliconeogênese a partir de piruvato, é inibida por ADP. Da mesma maneira, ADP inibe a fosfoenolpiruvato carboxiquinase. A piruvato carboxilase é ativada por acetil-CoA que, como o citrato, indica que o ciclo do ácido cítrico está produzindo energia e intermediários biossintéticos (Capítulo 17). Por isso, a gliconeogênese é favorecida quando a célula se encontra rica em precursores biossintéticos e ATP.

O equilíbrio entre a glicólise e a gliconeogênese no fígado é sensível à concentração de glicose no sangue

No fígado, as velocidades da glicólise e da gliconeogênese são ajustadas para manter os níveis sanguíneos de glicose. *A molécula sinalizadora, frutose 2,6-bisfosfato, estimula a fosfofrutoquinase* (PFK) *e inibe a frutose 1,6-bisfosfatase* (p. 479). Quando a glicose sanguínea está baixa, a frutose 2,6-bisfosfato perde um grupo fosforila para formar frutose 6-fosfato, que não mais

se liga à PFK. Como a concentração de frutose 2,6-bisfosfato é controlada para subir e baixar os níveis sanguíneos de glicose? Duas enzimas regulam a concentração desta molécula: uma fosforila a frutose 6-fosfato e outra desfosforila a frutose 2,6-bisfosfato. Frutose 2,6-bisfosfato é formada a partir de frutose 6-fosfato em uma reação catalisada pela *fosfofrutoquinase 2* (PFK2), uma enzima diferente da fosfofrutoquinase. A frutose 6-fosfato é formada pela hidrólise da frutose 2,6-bisfosfato por uma fosfatase específica, a *frutose bisfosfatase 2* (FBPase 2). O achado notável é *que tanto a PFK 2 como a FBPase 2 estão presentes em uma única cadeia peptídica de 55 kDa* (Figura 16.31). Esta enzima bifuncional contém um *domínio regulatório* N-terminal, seguido por um *domínio quinase* e um *domínio fosfatase.* PFK2 é semelhante à adenilatoquinase por ter um domínio alça P NTPase (Seção 9.4), enquanto FBPase lembra a fosfoglicerato mutase (p. 468). Lembrese de que a mutase é essencialmente uma fosfatase. Na enzima bifuncional, a atividade de fosfatase evoluiu de forma a ser específica para a F-2,6-BP. A enzima bifuncional propriamente provavelmente surgiu da fusão de genes que codificam os domínios de quinase e de fosfatase.

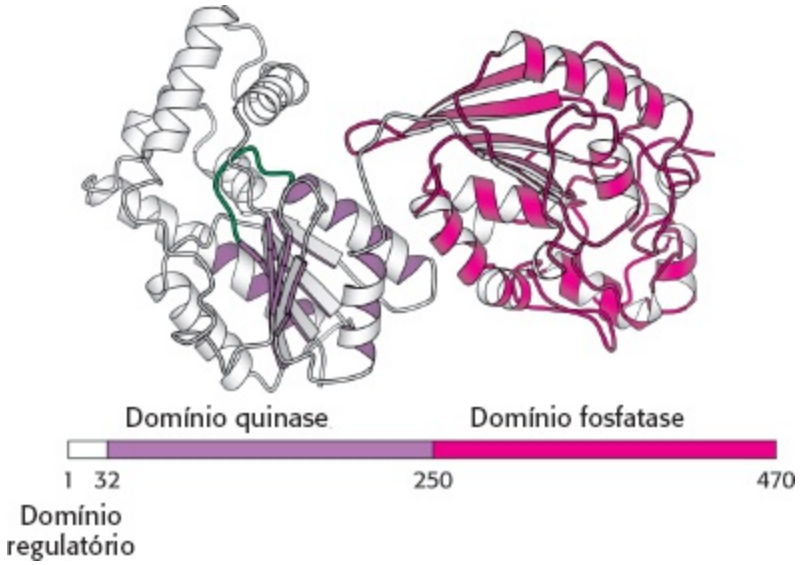


Figura 16.31 Estrutura de domínio da enzima bifuncional, fosfofrutoquinase 2. O domínio da quinase (púrpura) funde-se ao domínio da fosfatase (vermelho). O domínio de quinase é um domínio alça P NTP hidrolase, como indicado pelo sombreamento em púrpura (Seção 9.4). A barra representa a sequência de aminoácidos da enzima. [Desenhada a partir de 1BIF.pdb.]

O que determina se PFK2 ou FBPase 2 dominam as atividades da enzima bifuncional no fígado? As atividades de PFK2 e FBPase 2 são reciprocamente controladas pela *fosforilação de uma única serina.* Quando a glicose é escassa, como durante o jejum noturno, a elevação do nível sanguíneo do hormônio glucagon dispara uma cascata sinalizadora de AMP cíclico (Seção 14.1), levando à fosforilação dessa enzima bifuncional pela proteina quinase A (Figura 16.32). Esta modificação covalente ativa a FBPase2 e inibe a PFK2, baixando o nível de F-2,6-BP. A gliconeogênese predomina. A glicose formada no fígado nestas condições é essencial para a viabilidade do cérebro. A estimulação pelo glucagon da proteina quinase A também inativa a piruvato quinase no fígado (p. 480).

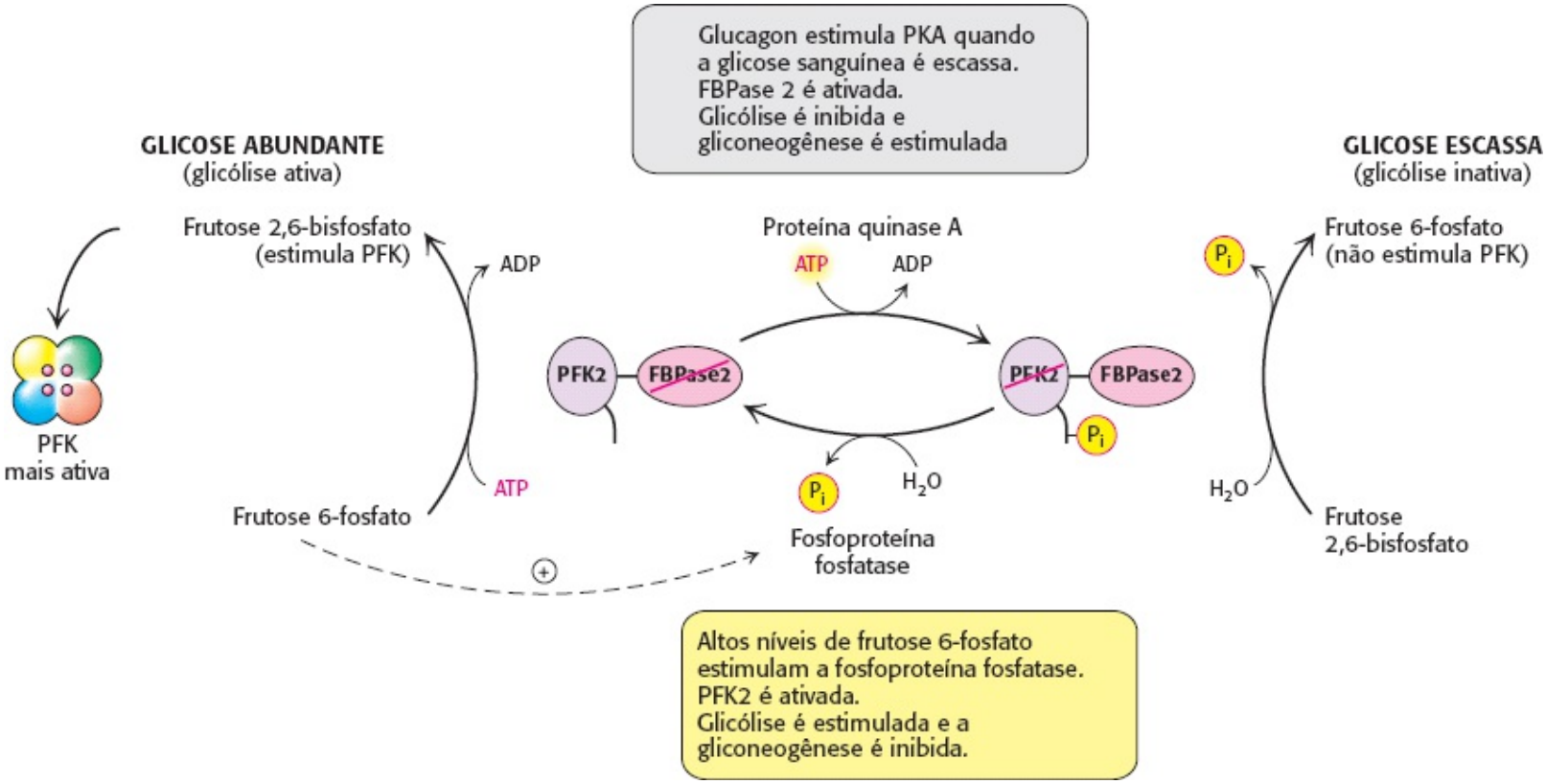


Figura 16.32 Controle da síntese e da degradação da frutose 2,6-bisfosfato. Níveis sanguíneos baixos de glicose, sinalizados pelo glucagon, levam à fosforilação da enzima bifuncional e a níveis mais baixos de frutose 2,6-bisfosfato, diminuindo a velocidade da glicólise. Níveis elevados de frutose 2,6-bisfosfato aceleram a formação de frutose 2,6-bisfosfato por facilitar a desfosforilação da enzima bifuncional.

Por outro lado, quando os níveis sanguíneos de glicose são altos, como após uma refeição, a gliconeogênese não é necessária. A insulina é secretada e inicia uma via de sinalização que ativa uma proteína fosfatase, que remove o grupo fosforila da enzima bifuncional. Esta modificação covalente ativa a PFK2 e inibe a FBPase2. A elevação resultante do nível de F-2, 6-BP acelera a glicólise. O controle coordenado da glicólise e da gliconeogênese é facilitado pela localização dos domínios de quinase e de fosfatase na mesma cadeia polipeptídica, assim como o domínio regulatório.

Os hormônios insulina e glucagon também regulam os teores de enzimas fundamentais. Estes hormônios alteram a expressão gênica basicamente por alterarem a velocidade de transcrição. Os níveis de insulina elevam-se após a alimentação, quando há fartura de glicose para a glicólise. Para promover a glicólise, a insulina estimula a expressão da fosfofrutoquinase, da piruvatoquinase e da enzima bifuncional que sintetiza e degrada F-2,6BP. O glucagon eleva-se durante o jejum, quando a gliconeogênese é necessária para repor a escassez de glicose. Para promover a gliconeogênese, o glucagon inibe a expressão das três enzimas glicolíticas reguladas e estimula, em vez disso, a produção de duas enzimas-chave da gliconeogênese, fosfoenolpiruvato carboxiquinase e frutose 1,6-bisfosfatase. O controle transcricional nos eucariontes é muito mais lento do que o controle alostérico, levando horas ou dias em vez de segundos a minutos. A riqueza e a complexidade do controle hormonal são exibidas graficamente pelo promotor do gene da fosfoenolpiruvato carboxiquinase, que contém sequências reguladoras que respondem à insulina, ao glucagon (pelos elementos de resposta ao cAMP), aos glicocorticoides e aos hormônios da tireoide (Figura 16.33).

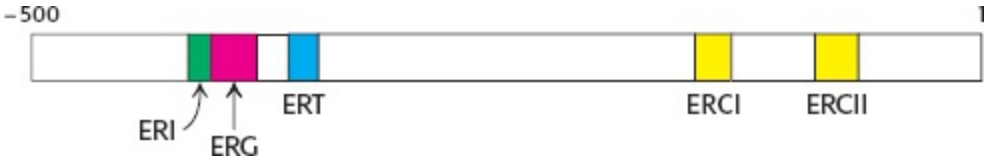


Figura 16.33 O promotor do gene da fosfoenolpiruvato carboxiquinase. O promotor tem aproximadamente 500 pb de comprimento e contém sequências regulatórias (elementos de resposta) que medeiam a ação de vários hormônios. Abreviaturas: ERI, elemento de resposta à insulina; ERG, elemento de resposta aos glicocorticoides; ERT, elemento de resposta aos hormônios da tireoide; ERCI e ERCII, elementos de resposta ao cAMP. [Segundo M.M. McGrane, J.S. Jun, Y.M. Hanson. *Trends Biochem. Sci.* 17: 40-44, 1992.]

Os ciclos de substrato amplificam sinais metabólicos e produzem calor

Um par de reações, tais como a fosforilação da frutose 6-fosfato em frutose 1,6-bisfosfato e sua hidrólise de volta à frutose 6-fosfato, é denominado *ciclo de substratos*. Como já foi mencionado, ambas as reações não estão totalmente ativas simultaneamente, na maioria das células, devido a controles alostéricos recíprocos. Contudo, estudos de marcação com isótopos mostram que alguma frutose 6-fosfato é fosforilada em frutose 1,6-bisfosfato mesmo durante a gliconeogênese. Há também um grau limitado de reciclagem em outros pares de reações opostas irreversíveis. Esta reciclagem foi considerada uma imperfeição no controle metabólico, e assim ciclos de substratos foram às vezes denominados *ciclos fúteis*. De fato, há condições patológicas, como a hipertermia maligna, na qual o controle é perdido e ambas as vias ocorrem rapidamente. Um resultado é a hidrólise rápida e descontrolada do ATP, gerando calor.

A despeito de tais circunstâncias extraordinárias, parece atualmente provável que os ciclos de substratos são biologicamente importantes. Uma possibilidade é que *os ciclos de substrato amplifiquem sinais metabólicos*. Suponha que a velocidade de conversão de A em B seja 100 e de B em A seja 90, dando um fluxo inicial efetivo de 10. Suponha que um efetor alostérico aumente a velocidade A → B em 20% para 120 e inversamente diminua B → A em 20% para 72. O novo fluxo efetivo será 48 e, portanto, uma variação de 20% nas velocidades das reações opostas levou a um aumento de 380% no fluxo efetivo. No exemplo mostrado na Figura 16.34, esta amplificação é conseguida pela rápida hidrólise do ATP. Sugeriu-se que o fluxo ao longo da via glicolítica pode aumentar até 1.000 vezes no início de exercício intenso. Como parece improvável que a ativação alostérica das enzimas por si só não explica este aumento do fluxo, a existência de ciclos de substrato explicaria parcialmente a rápida elevação da velocidade da glicólise.

O outro papel biológico potencial dos ciclos de substrato é a geração de calor pela hidrólise do ATP. Em abelhas da Europa, o ciclo é utilizado tanto para amplificação de sinal como para a geração de calor. A fosfofrutoquinase e a frutose 1,6-bisfosfatase no músculo de voo da abelha estão ativas simultaneamente. A ciclagem incrementa outros meios de termogênese, como calafrios, e amplifica o fluxo ao longo da via glicolítica na preparação da transição de repouso para o voo.

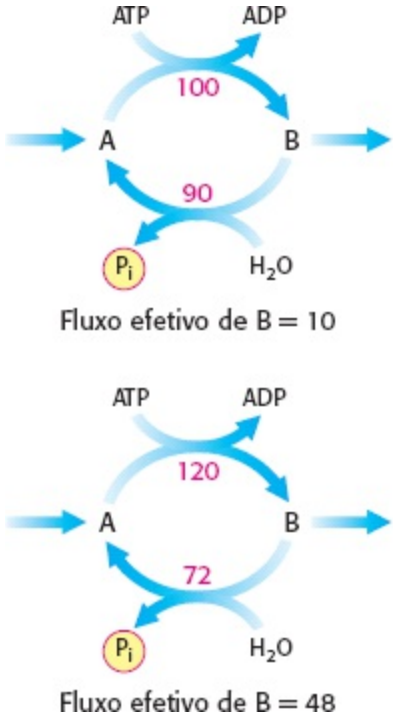


Figura 16.34 Ciclo de substratos. Este ciclo impulsionado pelo ATP opera em duas velocidades diferentes. Uma pequena variação nas velocidades das duas reações opostas resulta em uma grande variação no fluxo *efetivo* do produto B.

Lactato e alanina formados pela contração muscular são utilizados por outros órgãos

O lactato produzido pelo músculo esquelético ativo e pelas hemácias é uma fonte de energia para outros órgãos. As hemácias não possuem mitocôndrias e nunca podem oxidar completamente a glicose. No músculo esquelético em contração durante exercício vigoroso, a velocidade na qual a glicólise produz piruvato excede a velocidade de oxidação deste no ciclo do ácido cítrico. Nestas células, a lactato desidrogenase reduz o excesso de piruvato a lactato para restaurar o equilíbrio redox (p. 470). Contudo, o lactato é um "beco sem saída" no metabolismo. O lactato precisa ser convertido de novo em piruvato, antes que possa ser metabolizado. Tanto o piruvato como o lactato difundemse para fora destas células em direção ao sangue graças a carreadores. *No músculo esquelético em contração, a formação e a liberação de lactato permitem que o músculo gere ATP na ausência de oxigênio e desvia o ônus de metabolizar o lactato do músculo para outros órgãos.* O piruvato e o lactato na corrente sanguínea têm dois destinos. Em um deles, as membranas plasmáticas de algumas células, particularmente as do músculo cardíaco, contêm carreadores que as tornam muito permeáveis ao lactato e ao piruvato. Estas moléculas difundem-se do sangue para tais células permeáveis. Uma vez dentro destas células bem oxigenadas, o lactato pode ser revertido em piruvato e metabolizado pelo ciclo do acido cítrico e pela fosforilação oxidativa para gerar ATP. O emprego de lactato no lugar de glicose por estas células torna a glicose circulante mais disponível para as células musculares ativas. No outro destino, o excesso de lactato chega ao fígado e é convertido inicialmente em piruvato e, então, em glicose pela gliconeogênese. *O músculo esquelético em contração fornece lactato para o fígado, que o utiliza para sintetizar e liberar glicose. Assim, o fígado restaura o nível de glicose necessário para as células musculares ativas, que derivam o ATP da conversão glicolítica de glicose a lactato. Estas reações constituem o ciclo de Cori* (Figura 16.35).

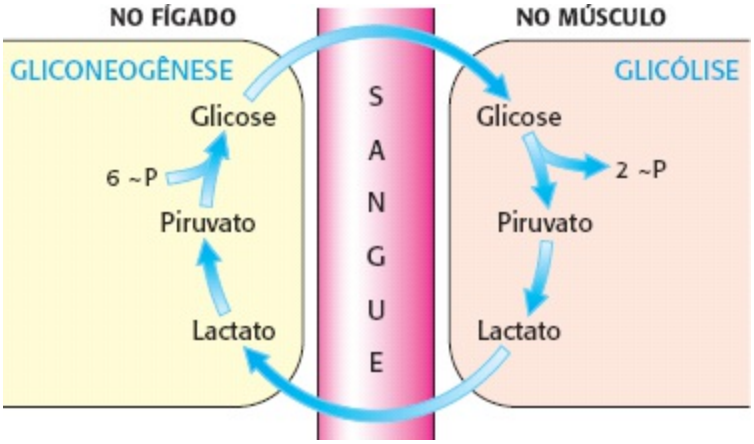


Figura 16.35 Ciclo de Cori. O lactato formado pelo músculo ativo é convertido em glicose pelo fígado. Este ciclo desvia parte do ônus metabólico do músculo ativo para o fígado.

Estudos mostram que a alanina, como o lactato, é um precursor importante de glicose no fígado. A alanina é produzida no músculo quando os arcabouços de carbono de alguns aminoácidos são utilizados como fonte de energia. Os nitrogênios desses aminoácidos são transferidos para o piruvato para formar alanina; a reação reversa ocorre no fígado. Este processo também ajuda a manter o equilíbrio nitrogenado. A inter-relação de glicólise e gliconeogênese é resumida na Figura 16.36, que exibe como estas vias ajudam a atender às necessidades energéticas de diferentes tipos de célula.

Formas isozímicas da lactato desidrogenase em tecidos diferentes catalisam a interconversão entre piruvato e lactato (Seção 10.2). A lactato desidrogenase é um tetrâmero de dois tipos de subunidades de 35 kDa codificadas por genes semelhantes: o tipo H predomina no coração e o homólogo M, nos músculos esqueléticos e no fígado. As subunidades associam-se para formarem cinco tipos de tetrâmeros: H_4, H_3M_1, H_2M_2, H_1M_3 e M_4. A isozima H_4 (tipo 1) tem maior afinidade pelos substratos do que a M_4 (tipo 5) e, diferente da M_4, é inibida alostericamente por níveis altos de piruvato. As outras isozimas têm propriedades intermediárias, dependendo da razão dos dois tipos de cadeias. A isozima H_4 oxida lactato a piruvato, que a seguir é utilizado como composto energético pelo coração por metabolismo aeróbico. De fato o músculo cardíaco nunca utiliza metabolismo anaeróbico. Ao contrário, M_4 é otimizada para operar no sentido oposto, ou seja, para converter piruvato em lactato e, assim, permitir que a glicólise ocorra em condições anaeróbicas. Vemos aqui um exemplo de como duplicação e divergência gênica produzem uma série de enzimas homólogas que fomentam a cooperação metabólica entre os órgãos.

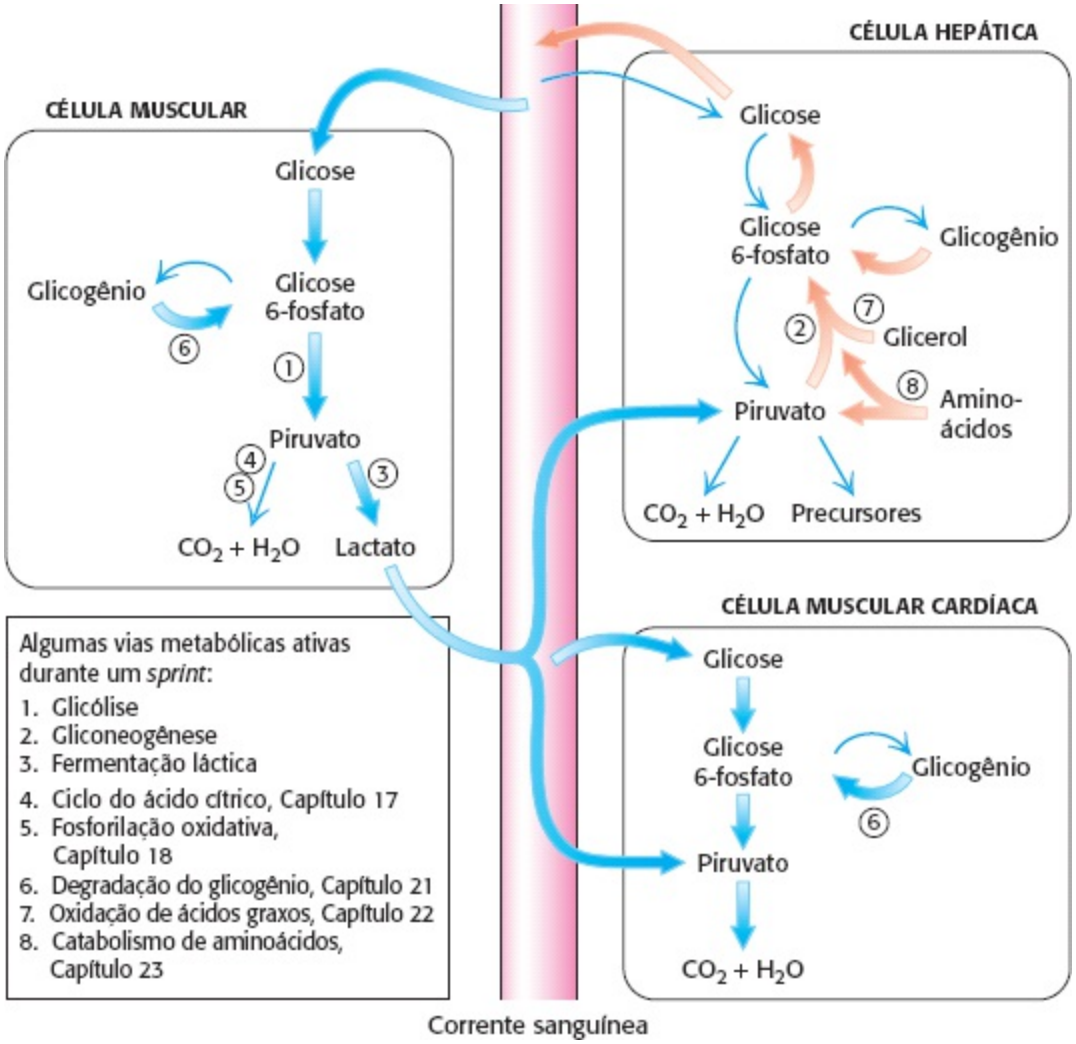


Figura 16.36 Integração entre vias metabólicas: Cooperação entre glicólise e gliconeogênese durante um *sprint*. Glicólise e gliconeogênese são coordenadas, de modo específico para cada tecido, para assegurar que sejam supridas as necessidades energéticas de todas as células. Considere um indivíduo durante um *sprint*. No músculo esquelético da perna, a glicose será metabolizada aerobicamente a CO_2 e H_2O ou, mais provavelmente (setas grossas) durante um *sprint*, anaerobicamente a lactato. No músculo cardíaco, o lactato pode ser convertido em piruvato e utilizado como composto energético, juntamente com a glicose, para aumentar a frequência cardíaca para sustentar o fluxo sanguíneo do indivíduo durante o *sprint*. A gliconeogênese, uma função primária do fígado, ocorrerá rapidamente (setas grossas) para assegurar que haja glicose suficiente no sangue para os músculos esqueléticos e cardíaco, bem como para outros tecidos. Glicogênio, glicerol e aminoácidos são outras fontes de energia que aprenderemos nos capítulos a seguir.

Glicólise e gliconeogênese estão evolucionariamente entrelaçadas

O metabolismo da glicose tem origens ancestrais. Os organismos vivos na biosfera primordial dependiam da geração anaeróbica de energia até que quantidades significativas de oxigênio começaram a se acumular há 2 bilhões de anos. Muito provavelmente as enzimas glicolíticas evoluíram de modo independente, e não por duplicação gênica, porque as enzimas glicolíticas com propriedades semelhantes não apresentam sequências semelhantes de aminoácidos. Embora existam quatro quinases e duas isomerases na via, tanto as comparações de sequência como as estruturais não sugerem que esses conjuntos de enzimas estejam relacionados uns com os outros por evolução divergente. O domínio comum de ligação a dinucleotídios encontrado nas desidrogenases (Figura 16.12) e os barris αβ são os únicos elementos repetitivos importantes.

Podemos especular sobre a correlação entre glicólise e gliconeogênese se pensarmos que a glicólise é constituída por dois segmentos: o metabolismo de hexoses (segmento superior) e o

metabolismo de trioses (segmento inferior). As enzimas do segmento superior são diferentes em algumas espécies e não existem em alguns microrganismos do domínio *Archaeae*, enquanto as enzimas do segmento inferior são bastante conservadas. De fato, quatro enzimas do segmento inferior são encontradas em todas as espécies. *Esta parte inferior da via é comum à glicólise e à gliconeogênese.* Esta parte comum das duas vias seria a parte mais antiga, constituindo o cerne ao qual as outras etapas foram adicionadas. A parte superior poderia variar de acordo com os carboidratos disponíveis para os organismos em evolução em nichos específicos. Curiosamente, esta parte central do metabolismo dos carboidratos consegue gerar precursores trioses da ribose, um componente do RNA e uma necessidade crítica para o mundo de RNA. Assim, deixamos a questão sem resposta. A via central original foi utilizada para a conversão de energia ou para biossíntese?

Resumo

16.1 A glicólise é uma via de conversão de energia em muitos organismos

A glicólise é o conjunto de reações que converte glicose em piruvato. As dez reações da glicólise ocorrem no citoplasma. No primeiro estágio, a glicose é convertida em frutose 1,6-bisfosfato por uma fosforilação, uma isomerização e uma segunda fosforilação. A frutose 1,6-bisfosfato é, a seguir, clivada pela aldolase à di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, que são prontamente interconversíveis. São consumidas nestas reações duas moléculas de ATP por molécula de glicose, que são o prelúdio para a síntese efetiva de ATP. No segundo estágio, é produzido ATP. Gliceraldeído 3-fosfato é oxidado e fosforilado para formar 1,3-bisfosfoglicerato, um acil fosfato com alto poder de transferência de fosforila. Esta molécula transfere um grupo fosforila para o ADP para originar ATP e 3-fosfoglicerato. Deslocamento de fosforila e uma desidratação formam fosfoenolpiruvato, um segundo intermediário com alto potencial de transferência de fosforila. Outra molécula de ATP é produzida quando fosfoenolpiruvato é convertido em piruvato. Há um ganho efetivo de duas moléculas de ATP na formação de duas moléculas de piruvato a partir de uma molécula de glicose.

O aceptor de elétrons na oxidação do gliceraldeído 3-fosfato é o NAD^+ que precisa ser regenerado para que a glicólise continue. Nos organismos aeróbicos, o NADH formado na glicólise transfere seus elétrons para o O_2 pela cadeia transportadora de elétrons, que assim regenera o NAD^+. Em condições anaeróbicas e em alguns microrganismos, o NAD^+ é regenerado pela redução do piruvato a lactato. Em outros microrganismos, NAD^+ é regenerado pela redução do piruvato a etanol. Estes dois processos são exemplos de fermentações.

16.2 A via glicolítica é rigidamente controlada

A via glicolítica tem dupla função: degrada glicose para produzir ATP e fornece elementos estruturais para a síntese de componentes celulares. A velocidade de conversão de glicose a piruvato é regulada para atender a essas duas demandas celulares principais. Em condições fisiológicas, as reações da glicólise são prontamente reversíveis, exceto aquelas catalisadas pela hexoquinase, pela fosfofrutoquinase e pela piruvato quinase. A fosfofrutoquinase, o elemento de regulação mais importante da glicólise, é inibida por altos níveis de ATP e citrato e é ativada por AMP e frutose 2,6-bisfosfato. No fígado, este bisfosfato sinaliza que a glicose é

abundante. Portanto, a fosfofrutoquinase é ativa quando energia ou elementos estruturais são necessários. A hexoquinase é inibida por glicose 6-fosfato, que se acumula quando a fosfofrutoquinase é inativa. ATP e alanina inibem alostericamente a piruvato quinase, o outro local de regulação, e a frutose 1,6-bisfosfato ativa a enzima. Em consequência, a piruvato quinase apresenta atividade máxima quando a carga energética é baixa e os intermediários glicolíticos se acumulam.

16.3 A glicose pode ser sintetizada a partir de precursores não carboidrato

A gliconeogênese é a síntese de glicose a partir de não carboidratos, como lactato, glicerol e aminoácidos. Várias das reações que convertem piruvato em glicose são comuns à glicólise. Contudo, a gliconeogênese necessita de quatro novas reações para contornar a irreversibilidade essencial de três reações da glicólise. Em duas das novas reações, piruvato é carboxilado nas mitocôndrias a oxaloacetato, que por sua vez é descarboxilado e fosforilado no citoplasma a fosfoenolpiruvato. Duas moléculas com alto poder de transferência de fosforila são consumidas nessas reações, que são catalisadas pela piruvato carboxilase e pela fosfoenolpiruvato carboxiquinase. Piruvato carboxilase contém um grupo prostético biotina. As outras reações características da gliconeogênese são as hidrólises da frutose 1,6-bisfosfato e da glicose 6-fosfato, que são catalisadas por fosfatases específicas. As principais "matérias-primas" para a gliconeogênese hepática são lactato e alanina produzidos a partir do piruvato pelo músculo esquelético ativo. A formação de lactato durante a atividade muscular intensa ganha tempo e desvia parte do ônus metabólico dos músculos para o fígado.

16.4 A gliconeogênese e a glicólise são reguladas reciprocamente

A gliconeogênese e a glicólise são reguladas reciprocamente, de modo que uma via é relativamente inativa, enquanto a outra está muito ativa. A fosfofrutoquinase e a frutose 1,6-bisfosfatase são pontos principais de regulação. A frutose 2,6-bisfosfato, uma molécula sinalizadora intracelular presente em níveis mais altos quando a glicose é farta, ativa a glicólise e inibe a gliconeogênese ao regular estas enzimas. A piruvato quinase e a piruvato carboxilase são reguladas por outros efetores, de modo que ambas não apresentem atividade máxima ao mesmo tempo. A regulação alostérica e a fosforilação reversível, que são rápidas, são complementadas por controle transcricional, que ocorre em horas ou dias.

Palavras-chave

α-amilase (p. 458)
anaeróbico obrigatório (p. 472)
biotina (p. 486)
ciclo de Cori (p. 494)
ciclo de substratos (p. 493)
enolfosfato (p. 469)
enzima bifuncional (p. 491)
etapa limitante (p. 478)
fermentação (p. 470)
fermentação alcoólica (p. 457)

fermentação láctica (p. 457)
fosfofrutoquinase (PFK) (p. 462)
fosfoglicerato mutase (p. 468)
fosforilação ao nível do substrato (p. 468)
glicólise (p. 457)
glicólise aeróbica (p. 482)
gliconeogênese (p. 457)
glicose 6-fosfatase (p. 488)
hexoquinase (p. 459)
intermediário tioéster (p. 466)
piruvato carboxilase (p. 486)
piruvato quinase (p. 469)
quinase (p. 461)
retroalimentação positiva (p. 480)
Rossmann fold (p. 473)

Questões

1. *Bruto versus efetivo.* A produção bruta de ATP do metabolismo da glicose a partir de duas moléculas de piruvato é de quatro moléculas de ATP. Contudo, a produção efetiva é apenas de duas moléculas de ATP. Por que são diferentes os valores bruto e efetivo?

2. *Quem toma? Quem dá?* A fermentação láctica e a fermentação alcoólica são reações de oxirredução. Identifique o último doador de elétrons e o aceptor de elétrons.

3. *Produção de ATP*. Cada uma das seguintes moléculas é processada a lactato pela glicólise. Quantos ATP são gerados a partir de cada molécula?

(a) Glicose 6-fosfato

(b) Di-hidroxiacetona fosfato

(c) Gliceraldeído 3-fosfato

(d) Frutose

(e) Sacarose

4. *Redundância enzimática?* Por que é vantajoso para o fígado ter hexoquinase e glicoquinase para fosforilar a glicose?

5. *Patrocinadores*. Algumas das pesquisas mais antigas sobre a glicólise foram apoiadas por cervejarias. Por que elas estariam interessadas na glicólise?

6. *Dose diária recomendada.* A dose diária recomendada da vitamina niacina é de 15 mg. Como seria afetada a glicólise pela carência de niacina?

7. *Quem é o primeiro?* Embora a hexoquinase e a fosfofrutoquinase catalisem etapas irreversíveis da glicólise e a etapa catalisada pela hexoquinase seja a primeira, a fosfofrutoquinase é, contudo, o marca-passo da glicólise. O que esta informação diria a você acerca do destino da glicose 6-fosfato formada pela hexoquinase?

8. *A tartaruga e a lebre*. Por que a regulação da fosfofrutoquinase pela carga energética não é tão importante no fígado como no músculo?

9. *Inversão do sentido*. Por que não podem as reações da via glicolítica simplesmente inverter o sentido para sintetizarem glicose?

10. *Obstáculos no caminho.* Que reações da glicólise não são prontamente reversíveis em condições intracelulares?

11. *Sem preservar*. Por que é melhor para os músculos "exportar" ácido láctico para o sangue durante exercício intenso?

12. *Après vous*. Por que é fisiologicamente vantajoso para o pâncreas utilizar GLUT2, com um valor alto de K_M, como transportador de glicose nas células β?

13. *Contorno.* No fígado, a frutose pode ser convertida em gliceraldeído 3-fosfato e di-hidroxiacetona fosfato sem passar pela reação regulada pela fosfofrutoquinase. Mostre as reações que tornam possível esta conversão. Por que a ingestão de altos níveis de frutose poderia ter efeitos fisiológicos deletérios?

14. *Problemas adiante*. Suponha que um microrganismo que era um anaeróbico obrigatório sofresse uma mutação que resultasse na perda da atividade da triose fosfato isomerase. Como esta perda afetaria a produção de ATP pela fermentação? Esse organismo conseguiria sobreviver?

15. *Química na cozinha*. A sacarose é comumente utilizada para conservar frutas. Por que a glicose não é adequada para a conservação de alimentos?

16. *Marcadores de carbono 1.* A glicose marcada com ^{14}C em C-1 é incubada com as enzimas glicolíticas e os cofatores necessários.

(a) Qual é a distribuição do ^{14}C no piruvato formado? (Suponha que a interconversão entre gliceraldeído 3-fosfato e di-hidroxiacetona fosfato seja muito rápida em comparação à etapa seguinte).

(b) Se a atividade específica do substrato glicose for de 10 mCi $mmol^{-1}$ (milicuries por mol, uma medida da radioatividade por mol), qual será a atividade específica do piruvato formado?

17. *Fermentação do ácido láctico*. (a) Escreva uma equação balanceada para conversão de glicose em lactato. (b) Calcule a variação padrão de energia livre desta reação utilizando os dados da Tabela 16.1 e o fato de que $\Delta G^{o'}$ é de – 25 kJ mol^{-1} (–6 kcal mol^{-1}) para a reação:

$$\text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{lactato} + \text{NAD}^+$$

Qual é a variação de energia livre (ΔG, não $\Delta G^{o'}$) desta reação quando as concentrações dos reagentes são: glicose 5 mM, lactato 0,05 mM, ATP 2 mM, ADP 0,2 mM e P_i 1 mM?

18. *Alto potencial*. Qual é a razão de equilíbrio entre fosfoenolpiruvato e piruvato em condições padrão quando [ATP]/[ADP] = 10?

19. *Equilíbrio hexose-triose*. Quais são as concentrações no equilíbrio de frutose 1,6-bisfosfato, di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, quando 1 mM de frutose 1,6-bisfosfato é incubado com aldolase nas condições padrões?

20. *Dupla marcação*. 3-Fosfoglicerato marcado uniformemente com ^{14}C é incubado com 1,3-BPG marcado com ^{32}P no C-1. Qual é a distribuição dos radioisótopos do 2,3-BPG formado por ocasião do acréscimo da BPG mutase?

21. *Um análogo informativo.* A xilose tem a mesma estrutura da glicose, exceto por ter um átomo de hidrogênio em C-5 em vez do grupo hidroximetila. A velocidade de hidrólise do ATP pela hexoquinase é pronunciadamente acentuada pelo acréscimo de xilose. Por quê?

22. *Carboidratos diferentes.* A infusão intravenosa de frutose em voluntários saudáveis leva a um aumento de duas a cinco vezes no nível de lactato no sangue, um aumento bem maior do que o observado após a infusão da mesma quantidade de glicose.

(a) Por que a glicólise é mais rápida após a infusão de frutose?

(b) A frutose tem sido utilizada no lugar da glicose para alimentação intravenosa, por que não é prudente a utilização de frutose?

23. *Sempre há barreiras*. Que barreira energética impede a glicólise de simplesmente ocorrer no sentido oposto para sintetizar glicose? Qual é o custo energético para sobrepor esta barreira?

24. *Sem desperdícios.* Por que a conversão de ácido láctico sanguíneo em glicose no fígado é melhor para o organismo?

25. *Contornando os obstáculos no caminho*. Como são as reações irreversíveis da glicólise contornadas na gliconeogênese?

26. *Inutilidades evitadas*. Quais são os meios de regulação que impedem que altos níveis de atividade da glicólise e da gliconeogênese ocorram simultaneamente?

27. *Necessidades diferentes*. O fígado é principalmente um tecido gliconeogênico, enquanto o músculo é principalmente glicolítico. Por que esta divisão de trabalho é fisiologicamente sensata?

28. *Mutantes metabólicos.* Qual seria o efeito sobre a capacidade de um organismo utilizar glicose como fonte energética se uma mutação inativasse a glicose 6-fosfatase hepática?

29. *Nunca me deixe ir embora*. Por que a falta de atividade da glicose 6-fosfatase no cérebro e nos músculos faz sentido em termos fisiológicos?

30. *Contando compostos de alta energia 1*. Quantas moléculas de NTP são necessárias para a síntese de uma molécula de glicose a partir de duas moléculas de piruvato? Quantas moléculas de NADH?

31. *Contando compostos de alta energia 2*. Quantas moléculas de NTP são necessárias para sintetizar glicose a partir de cada um dos seguintes compostos?

(a) Glicose 6-fosfato

(b) Frutose 1,6-bisfosfato

(c) Duas moléculas de oxaloacetato

(d) Duas moléculas de di-hidroxiacetona fosfato

32. *Uma ajuda oportuna*. Como as enzimas que removem os grupos amino da alanina e do aspartato

poderiam contribuir para a gliconeogênese?

33. *Mais mutantes metabólicos*. Preveja o efeito de cada uma das seguintes mutações sobre o ritmo da glicólise nos hepatócitos:

(a) Perda do sítio alostérico para ATP da fosfofrutoquinase

(b) Perda do sítio de ligação para citrato da fosfofrutoquinase

(c) Perda do domínio de fosfatase da enzima bifuncional que controla o nível de frutose 2,6-bisfosfato

(d) Perda do sítio de ligação para frutose 1,6-bisfosfato da piruvato quinase

34. *Outro mutante metabólico.* Quais são as prováveis consequências de um distúrbio genético que torna a frutose 1,6-bisfosfatase hepática menos sensível à regulação pela frutose 2,6-bisfosfato?

35. *Ladrão de biotina*. A avidina, uma proteína de 70 kDa da clara do ovo, apresenta afinidade bem alta pela biotina. De fato, é um inibidor bem específico das enzimas com biotina. Quais das seguintes conversões seriam bloqueadas pelo acréscimo de avidina a um homogenato de células?

(a) Glicose → piruvato

(b) Piruvato → glicose

(c) Oxaloacetato → glicose

(d) Malato → oxaloacetato

(e) Piruvato → oxaloacetato

(f) Gliceraldeído 3-fosfato → frutose 1,6-bisfosfato

36. *Marcadores de carbono 2.* Se células que sintetizam glicose a partir de lactato fossem expostas a CO_2 marcado com ^{14}C, qual seria a distribuição da marcação na glicose recém-sintetizada?

37. *Envenenamento por arseniato*. O arseniato (AsO_4^{-3}) é muito semelhante ao P_i em estrutura e reatividade. Na reação catalisada pela gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, o arseniato consegue substituir o fosfato no "ataque" ao intermediário tioéster rico em energia. O produto desta reação, 1-arseno-3-fosfoglicerato, é instável. Ele e outros acil arseniatos são rápida e espontaneamente hidrolisados. Qual é o efeito do arseniato sobre a geração de energia em uma célula?

38. *Reduzir, reutilizar, reciclar.* Na conversão de glicose a duas moléculas de lactato, o NADH gerado antes na via é oxidado a NAD^+. Por que não é vantajoso para a célula simplesmente produzir mais NAD^+, de modo que a regeneração não fosse necessária? Afinal de contas, a célula pouparia muito mais energia por não ser mais necessário sintetizar a lactato desidrogenase.

39. *Adenilato ciclase novamente.* Adenilato ciclase, uma enzima abordada em detalhes no Capítulo 9, é responsável pela interconversão do *pool* de nucleotídios adenilato:

$$ADP + ADP \rightleftharpoons ATP + AMP$$

A constante de equilíbrio para esta reação é próxima de 1, pois o número de ligações fosfoanidrido é o mesmo de cada lado da equação. Utilizando a equação da constante de equilíbrio para esta reação,

mostre por que as variações de [AMP] são um indicador mais efetivo do *pool* de adenilato do que a [ATP].

40. *Propósitos contraditórios?* A gliconeogênese ocorre durante o exercício intenso, o que parece ilógico. Por que um organismo sintetizaria glicose e ao mesmo tempo usaria glicose para gerar energia?

41. *Vias estimuladoras*. Compare as estoiquiometrias da glicólise e da gliconeogênese. Lembre que o aporte de um equivalente de ATP altera a constante de equilíbrio de uma reação em um fator de aproximadamente 10^8 (Seção 15.2). Por qual fator os compostos adicionados, com alto potencial de fosforila, alteram a constante de equilíbrio da gliconeogênese?

Questão sobre mecanismo

42. *Argumento por analogia.* Proponha um mecanismo para a conversão de glicose 6-fosfato em frutose 6-fosfato pela fosfoglicose isomerase com base no mecanismo da triose fosfato isomerase.

Questões | Integração de capítulos

43. *Não apenas para energia.* Indivíduos com galactosemia exibem anormalidades no sistema nervoso central até mesmo se a galactose for eliminada da dieta. O motivo preciso não é conhecido. Sugira uma explicação plausível.

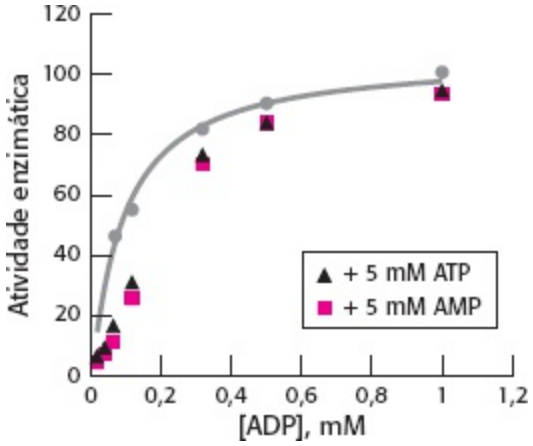
44. *Informe a função.* Frutose 2,6-bisfosfato é um potente estimulante da fosfofrutoquinase. Explique como a frutose 2,6-bisfosfato funcionaria no modelo combinado para as enzimas alostéricas.

Questões | Interpretação de dados

45. *Algo incomum.* Recentemente foi isolada a fosfofrutoquinase de *Pyrococcus furiosus* (microrganismo do domínio *Archaea*, fenótipo hipertermofílico). Ela foi sujeita à análise bioquímica padrão para determinar os parâmetros catalíticos básicos. Os processos em estudos eram da forma:

Frutose 6-fosfato + $(x - P_i) \rightarrow$
Frutose 1,6-bisfosfato + (x)

O ensaio determinou o aumento de frutose 1,6-bisfosfato. São exibidos alguns resultados no gráfico a seguir.

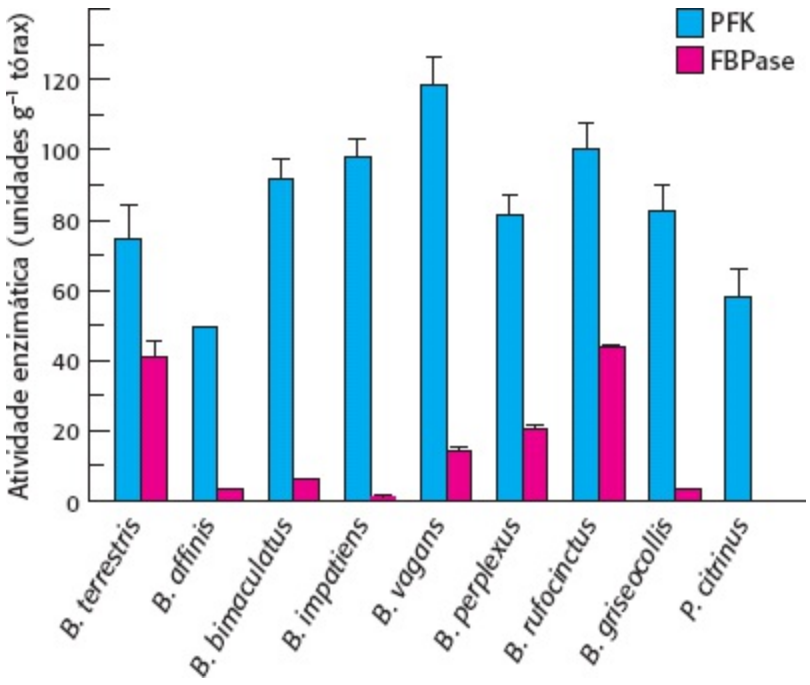


[Dados a partir de J. E. Tuininga *et al*. *J. Biol. Chem*. 274:21023-21028, 1999.]

(a) Qual é a diferença entre a fosfofrutoquinase do *P. furiosus* e a fosfofrutoquinase descrita neste capítulo?

(b) Quais os efeitos do AMP e do ATP sobre a reação com ADP?

46. *Resfriando abelhas*. A princípio, um ciclo fútil que inclui fosfofrutoquinase e frutose 2,6-bisfosfatase poderia ser utilizado para produzir calor. O calor poderia ser empregado para aquecer tecidos. Por exemplo, foi relatado que determinadas abelhas do gênero *Bombus* utilizam tal ciclo fútil para aquecer seus músculos de voo em manhãs frias.



[Segundo J. F. Staples, E. L. Koen e T. M. Laverty, *J. Exp. Biol*. 207:749-754, 2004, p. 751.]

Cientistas executaram uma série de experiências para determinar se algumas espécies dessas abelhas utilizam este ciclo fútil. A abordagem usada foi a determinação da atividade da PFK e da F-2, 6BPase no músculo de voo.

(a) Qual era a base racional para comparar a atividade dessas duas enzimas?

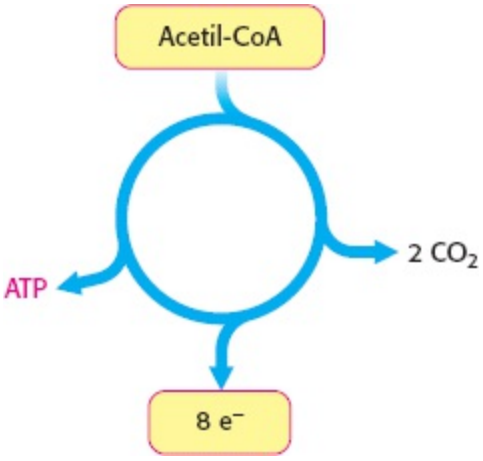
(b) Os seguintes dados exibem a atividade de ambas as enzimas de várias espécies de abelha (gêneros *Bombus* e *Psithyrus*). Estes resultados apoiam a noção que as abelhas utilizam ciclos fúteis para produzir calor? Explique.

(c) Em quais espécies pode ocorrer o ciclo fútil? Explique seu raciocínio.

(d) Esses resultados provam que o ciclo fútil não participa da produção de calor?

Ciclo do Ácido Cítrico

17



As rotatórias funcionam como nós centralizadores facilitando o fluxo. O ciclo do ácido cítrico é o eixo bioquímico da célula, oxidando fontes energéticas de carbono, geralmente na forma de acetil-CoA, e e fornecendo precursores para a biossíntese. [(À esquerda) Lynn Saville/Getty Images.]

SUMÁRIO

17.1 Piruvato desidrogenase conecta a glicólise ao ciclo do ácido cítrico

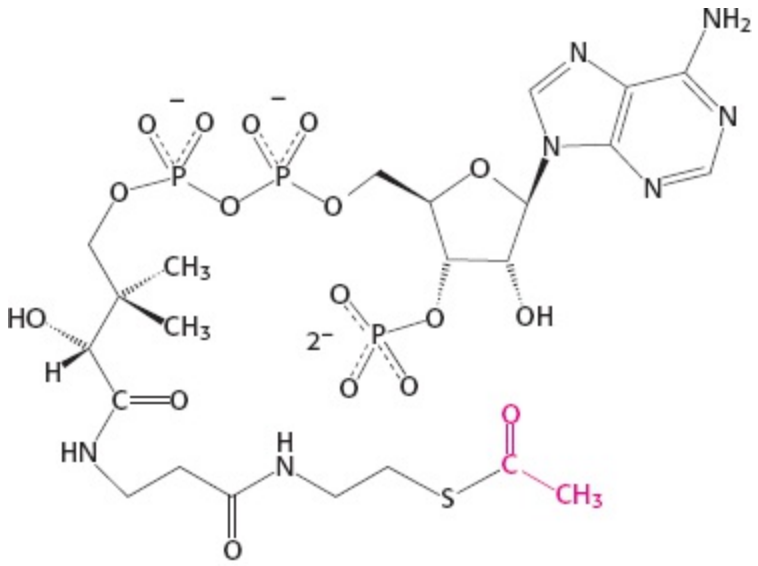
17.2 O ciclo do ácido cítrico oxida duas unidades de carbono

17.3 Aentrada no ciclo do ácido cítrico e o metabolismo por meio dele são controlados

17.4 O ciclo do ácido cítrico é uma fonte de precursores da biossíntese

17.5 O ciclo do glioxilato possibilita que plantas e bactérias cresçam em acetato

O metabolismo de glicose a piruvato na glicólise, um processo anaeróbico, coleta apenas uma fração do ATP disponível a partir da glicose. A maior parte do ATP gerado no metabolismo provém do processamento aeróbico da glicose. Esse processo começa com a oxidação completa de derivados da glicose em dióxido de carbono. Essa oxidação ocorre em uma série de reações denominada *ciclo do ácido cítrico*, também conhecido como *ciclo do ácido tricarboxílico* (TCA), ou *ciclo de Krebs*. O ciclo do ácido cítrico é a *via comum final da oxidação de moléculas energéticas* – carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos. A maioria das moléculas energéticas entra no ciclo na forma de *acetil coenzima A*.



Acetil coenzima A (acetil-CoA)

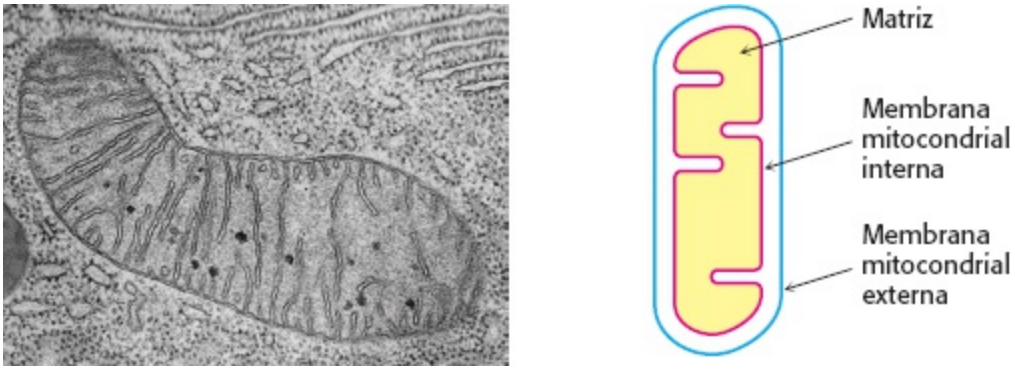


Figura 17.1 Mitocôndria. A dupla membrana da mitocôndria é bem evidenciada nessa micrografia eletrônica. As numerosas invaginações da membrana mitocondrial interna são denominadas cristas. A descarboxilação oxidativa do piruvato e a sequência de reações no ciclo do ácido cítrico ocorrem na matriz. [(À esquerda) Omikron/Photo Researchers.)].

Em condições aeróbicas, o piruvato gerado a partir da glicose sofre descarboxilação oxidativa formando acetil-CoA. Nos eucariotos as reações do ciclo do ácido cítrico ocorrem no interior das mitocôndrias (Figura 17.1), ao contrário das reações de glicólise, que ocorrem no citoplasma.

O ciclo do ácido cítrico coleta elétrons de alta energia

O ciclo do ácido cítrico é o eixo metabólico central da célula. É a passagem para o metabolismo aeróbico de qualquer molécula que pode ser transformada em um grupo acetila ou em um componente

do ciclo do ácido cítrico. O ciclo também é uma importante fonte de precursores dos elementos estruturais de muitas outras moléculas como aminoácidos, bases nucleotídica e porfirina (o componente orgânico do heme). O oxaloacetato, um componente do ciclo do ácido cítrico, também é um importante precursor de glicose (Seção 16.3).

Qual é a função do ciclo do ácido cítrico na transformação das moléculas energéticas em ATP? É preciso lembrar que as moléculas energéticas são compostos de carbono que podem ser oxidados – ou seja, podem perder elétrons (Capítulo 15). O ciclo do ácido cítrico inclui uma série de reações de oxirredução que resultam na oxidação de um grupo acetila em duas moléculas de dióxido de carbono. Essa oxidação gera elétrons de alta energia que serão utilizados para impulsionar a síntese de ATP. *A função do ciclo do ácido cítrico é coletar elétrons de alta energia a partir de átomos de carbono.*

O padrão global do ciclo do ácido cítrico é mostrado na Figura 17.2. Um composto com quatro carbonos (oxaloacetato) é condensado com uma unidade acetila contendo dois carbonos para produzir ácido tricarboxílico com seis carbonos. O composto com seis carbonos libera CO_2 duas vezes em duas reações sucessivas de descarboxilação oxidativa que produzem elétrons de alta energia e um composto com quatro carbonos. Esse composto é processado para regenerar oxaloacetato, que pode reiniciar o ciclo. Dois átomos de carbono entram no ciclo na forma de uma unidade acetila e dois átomos de carbono deixam o ciclo na forma de duas moléculas de CO_2.

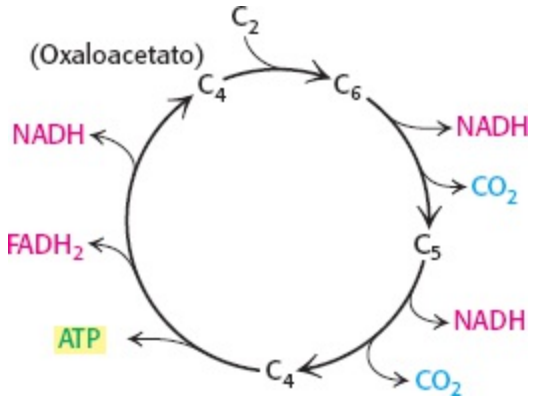


Figura 17.2 Resumo do ciclo do ácido cítrico. O ciclo do ácido cítrico oxida unidades com dois carbonos, produzindo duas moléculas de CO_2, uma molécula de ATP e elétrons de alta energia na forma de NADH e $FADH_2$.

Observe que o ciclo do ácido cítrico, por si só, não gera muito ATP nem inclui oxigênio como reagente (Figura 17.3). Na verdade, o ciclo do ácido cítrico remove elétrons da acetil-CoA e usa esses elétrons para formar NADH e $FADH_2$. Três íons hidreto (portanto, seis elétrons) são transferidos para três moléculas de nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD^+), e um par de átomos de hidrogênio (portanto, dois elétrons) é transferido para uma molécula de flavina adenina dinucleotídios (FAD). Esses carreadores de elétrons produzem nove moléculas de ATP quando são oxidados por O_2 na *fosforilação oxidativa* (Capítulo 18). Os elétrons liberados na reoxidação de NADH e $FADH_2$ fluem através de uma série de proteínas de membrana (conhecidas como *cadeia de transporte de elétrons*) para gerar um gradiente de prótons através da membrana. Esses prótons fluem, posteriormente, através da ATP sintase para gerar ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico.

O ciclo do ácido cítrico, em conjunto com a fosforilação oxidativa, fornece boa parte da energia utilizada pelas células aeróbicas – nos seres humanos, mais de 90%. É extremamente eficiente porque a oxidação de um número limitado de moléculas do ciclo do ácido cítrico consegue gerar grandes quantidades de NADH e $FADH_2$. Observe na Figura 17.2 que a molécula de quatro carbonos,

oxaloacetato, que inicia a primeira etapa do ciclo do ácido cítrico, é regenerada ao final de uma passagem pelo ciclo. Assim sendo, uma molécula de oxaloacetato consegue participar na oxidação de muitas moléculas acetila.

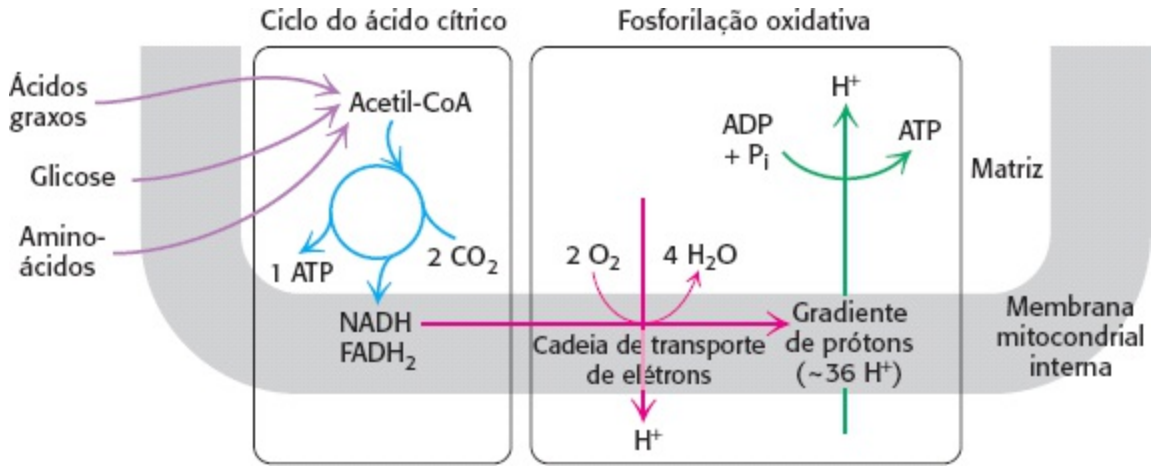


Figura 17.3 Respiração celular. O ciclo do ácido cítrico constitui o primeiro estágio na respiração celular, a retirada de elétrons de alta energia dos compostos de carbono na forma de NADH e $FADH_2$ (à esquerda). Esses elétrons reduzem O_2 para gerar um gradiente de prótons (via em vermelho), que é usada para sintetizar ATP (via em verde). A redução de O_2 e a síntese de ATP constituem a fosforilação oxidativa.

17.1 Piruvato desidrogenase conecta a glicólise ao ciclo do ácido cítrico

Os carboidratos, sobretudo a glicose, são processados por glicólise em piruvato (Capítulo 16). Em condições anaeróbicas, o piruvato é convertido em lactato ou etanol, dependendo do organismo. Em condições aeróbicas, o piruvato é transportado para o interior das mitocôndrias por uma proteína carreadora específica embebida na membrana mitocondrial. Na matriz mitocondrial, o piruvato sofre descarboxilação oxidativa pelo *complexo piruvato desidrogenase* para formar acetil-CoA.

$$\text{Piruvato} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{acetil-CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Essa reação irreversível é o vínculo entre a glicólise e o ciclo do ácido cítrico (Figura 17.4). Observe que o complexo piruvato desidrogenase produz CO_2 e captura elétrons de alto potencial de transferência na forma de NADH. Assim sendo, a reação da piruvato desidrogenase apresenta muitas das características essenciais das reações do próprio ciclo do ácido cítrico.

O complexo piruvato desidrogenase nada mais é que um complexo grande e extremamente integrado de três enzimas distintas (Tabela 17.1). O complexo piruvato desidrogenase é um membro de uma família de complexos homólogos que incluem a enzima do ciclo do ácido cítrico α-cetoglutarato desidrogenase (p. 511). Esses complexos são gigantes, maiores do que ribossomos, com massas moleculares que variam de 4 milhões a 10 milhões de dáltons (Figura 17.5). Como veremos mais adiante, suas estruturas complexas possibilitam o transporte de grupos de um sítio ativo para outro, conectadas ao cerne da estrutura.

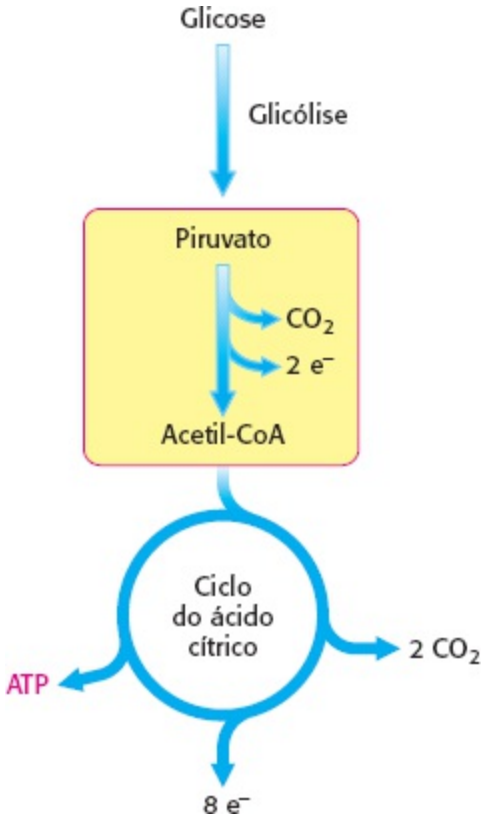


Figura 17.4 O vínculo entre glicólise e o ciclo do ácido cítrico. O piruvato produzido na glicólise é convertido em acetil-CoA, a fonte de energia do ciclo do ácido cítrico.

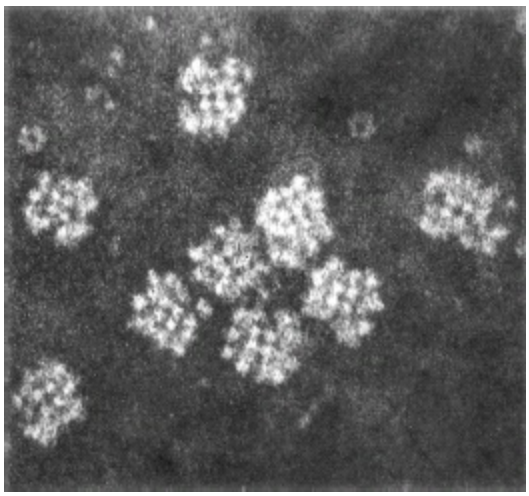


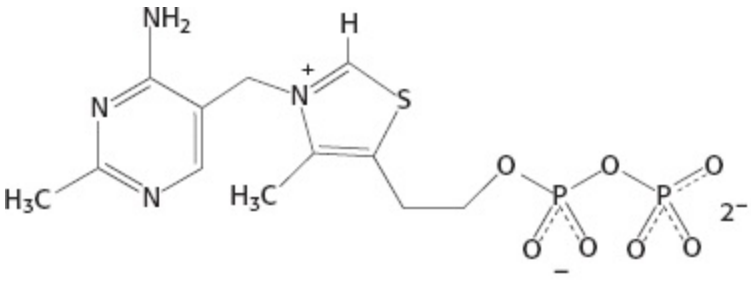
Figura 17.5 Micrografia eletrônica do complexo piruvato desidrogenase de *E. coli*. [Cortesia de Dr. Lester Reed.].

Tabela 17.1 Complexo piruvato desidrogenase da *E. coli*.

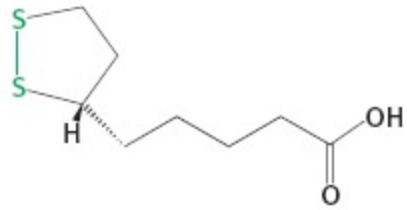
Enzima	Abreviatura	Número de cadeias	Grupo prostético	Reação catalisada
Componente piruvato desidrogenase	E_1	24	TPP	Descarboxilação oxidativa do piruvato
Di-hidrolipoil transacetilase	E_2	24	Lipoamida	Transferência de grupo acetila para CoA
Di-hidrolipoil desidrogenase	E_3	12	FAD	Regeneração da forma oxidada da lipoamida

Mecanismo | A síntese de acetil coenzima A a partir do piruvato exige três enzimas e cinco coenzimas

O mecanismo da reação da piruvato desidrogenase é extremamente complexo, mais do que é sugerido por sua estequiometria simples. A reação exige a participação das três enzimas do complexo piruvato desidrogenase e de cinco coenzimas. As coenzimas *tiamina pirofosfato* (TPP), *ácido lipoico* e *FAD* atuam como cofatores catalíticos e CoA e NAD^+ são cofatores estequiométricos (cofatores que atuam como substratos).

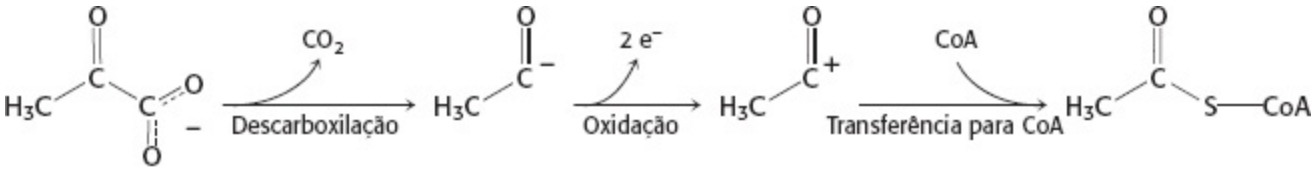


Tiamina pirofosfato (TPP)



Ácido lipoico

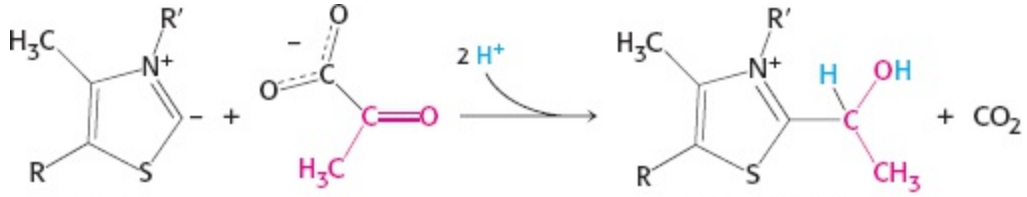
A conversão de piruvato em acetil-CoA tem três etapas: descarboxilação, oxidação e transferência do grupo acetila resultante para a CoA.



Piruvato — Acetil-CoA

Essas etapas têm de ser acopladas para preservar a energia livre proveniente da etapa de descarboxilação para impulsionar a formação de NADH e acetil-CoA.

1. *Descarboxilação*. O piruvato se combina com TPP e, depois, é descarboxilado para fornecer hidroxietil-TPP (Figura 17.6).



Carbânion da TPP — Piruvato — Hidroxietil-TPP

Essa reação é catalisada pelo *componente piruvato desidrogenase* (E_1) do complexo multienzimático. TPP é o grupo prostético do componente piruvato desidrogenase.

2. *Oxidação*. O grupo hidroxietila conectado a TPP é *oxidado* para formar um grupo acetila enquanto é transferido simultaneamente para lipoamida, um derivado do ácido lipoico que é ligado à cadeia lateral de um resíduo lisina por uma ligação amida. Observe que essa transferência resulta na formação de uma ligação tioéster rica em energia.

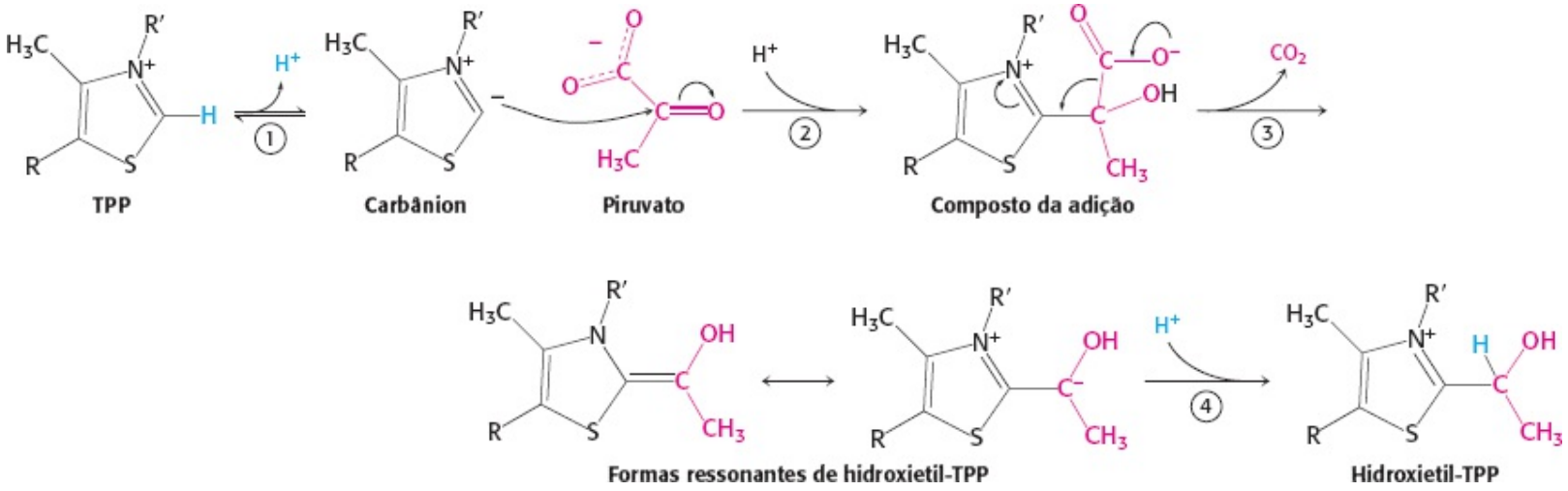
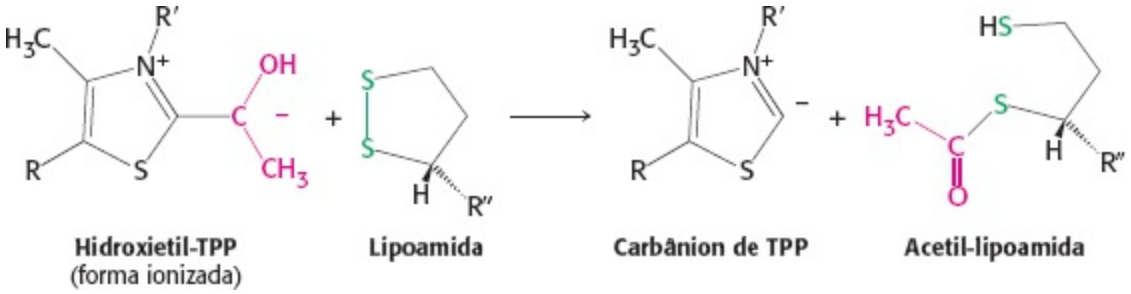
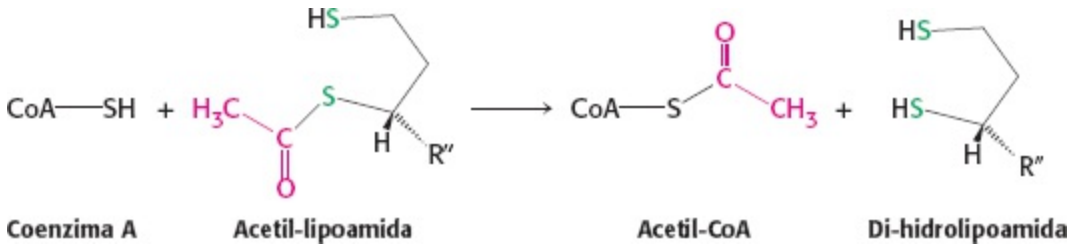


Figura 17.6 Mecanismo da reação da descarboxilação de E_1. E_1 é o componente piruvato desidrogenase do complexo piruvato desidrogenase. Uma propriedade principal do grupo prostético, TPP, é que o átomo de carbono entre os átomos de nitrogênio e enxofre no anel tiazólico é muito mais ácido do que a maioria dos grupos =CH– com um valor de pKa perto de 10. (1) Este carbono ioniza para formar um um carbânion. (2) O carbânion prontamente se adiciona ao grupo carbonila do piruvato. (3) Esta adição é acompanhada pela descarboxilação do piruvato. O anel do TPP carregado positivamente atua como um captador de elétrons que estabiliza a carga negativa que é transferida para o anel como parte da descarboxilação. (4) A protonação resulta no hidroxietil-TPP.



O oxidante nesta reação é o grupo dissulfeto da lipoamida, que é reduzido a sua forma dissulfidrila. Essa reação, também catalisada pelo componente da piruvato desidrogenase E_1, produz *acetil-lipoamida*.

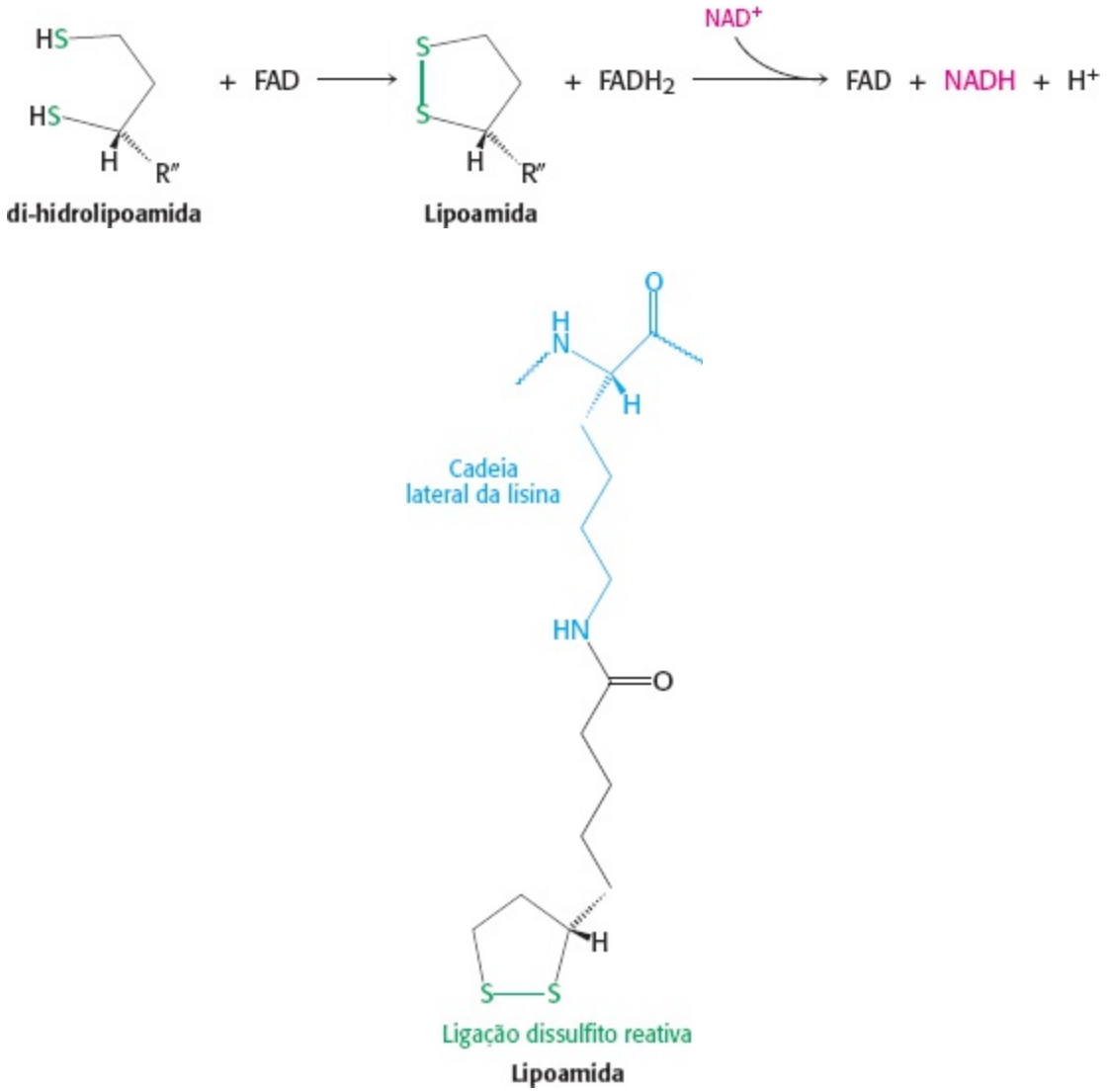
3. *Formação de acetil-CoA. O grupo acetila é transferido de acetil-lipoamida para CoA para formar acetil-CoA.*



A di-hidrolipoil transacetilase (E_2) catalisa essa reação. A ligação tioéster rica em energia é preservada enquanto o grupo acetila é transferido para CoA. É preciso lembrar que a CoA atua como carreador de muitos grupos acila ativados, dos quais o grupo acetila é o mais simples (Seção 15.3). Acetil-CoA, a fonte de energia (combustível) do ciclo do ácido cítrico, é gerada a partir do piruvato.

O complexo piruvato desidrogenase não consegue completar outro ciclo catalítico até a di-hidrolipoamida ser oxidada a lipoamida. Em uma quarta etapa, *a forma oxidada de lipoamida é*

regenerada pela di-hidrolipoil desidrogenase (E_3). Dois elétrons são transferidos para um grupo prostético FAD da enzima e, depois, para NAD^+.



Essa transferência de elétrons de FAD para NAD^+ é incomum porque a função habitual de FAD é receber elétrons de NADH. O potencial de transferência de elétrons de FAD é aumentado pelo ambiente químico nessa enzima, possibilitando que ela transfira elétrons para NAD^+. As proteínas que apresentam uma associação firme com FAD ou flavina mononucleotídio (FMN) são denominadas *flavoproteínas*.

Ligações flexíveis permitem que a lipoamida se mova entre diferentes sítios ativos

As estruturas de todas as enzimas componentes do complexo piruvato desidrogenase são conhecidas, embora sejam de espécies e complexos diferentes. Desse modo, agora é possível elaborar um modelo atômico do complexo para compreender sua atividade (Figura 17.7).

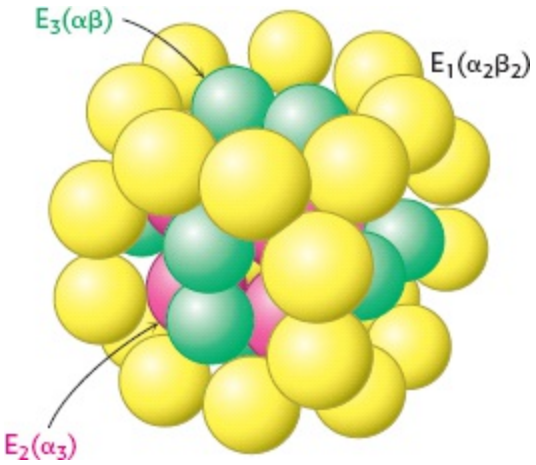


Figura 17.7 Representação esquemática do complexo piruvato desidrogenase. O cerne da transacetilase (E_2) é demonstrado em vermelho; o componente piruvato desidrogenase (E_1), em amarelo; e a di-hidrolipoil desidrogenase (E3), em verde.

O cerne do complexo é formado pelo componente transacetilase E_2. A transacetilase consiste em oito trímeros catalíticos que formam um cubo oco. Cada uma das três subunidades formando um trímero tem três domínios princípios (Figura 17.8). No aminoterminal há um pequeno domínio que contém um cofator flexível, lipoamida, ligado a um resíduo de lisina. Esse domínio é homólogo aos domínios de ligação a biotina, como o da piruvato carboxilase (ver Figura 16.26). O domínio lipoamida é seguido por um pequeno domínio que interage com E_3 no interior do complexo. Um domínio maior, domínio transacetilase, completa uma subunidade E_2. E_1 é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ e E_3 é um dímero $\alpha\beta$. Múltiplas cópias de E_1 e E_3 circundam o cerne de E_2. Como os três sítios ativos distintos atuam em conjunto (Figura 17.9)? A resposta é um "braço" lipoamida longo e flexível da subunidade E_2, que carreia substrato de um sítio ativo para outro.

1. O piruvato é descarboxilado no sítio ativo da E_1, formando o intermediário hidroxietil-TPP e o primeiro produto que deixa a enzima, CO_2. Esse sítio ativo se localiza profundamente no complexo E_1, conectado à superfície da enzima por um longo canal hidrofóbico (com 20 Å de comprimento).

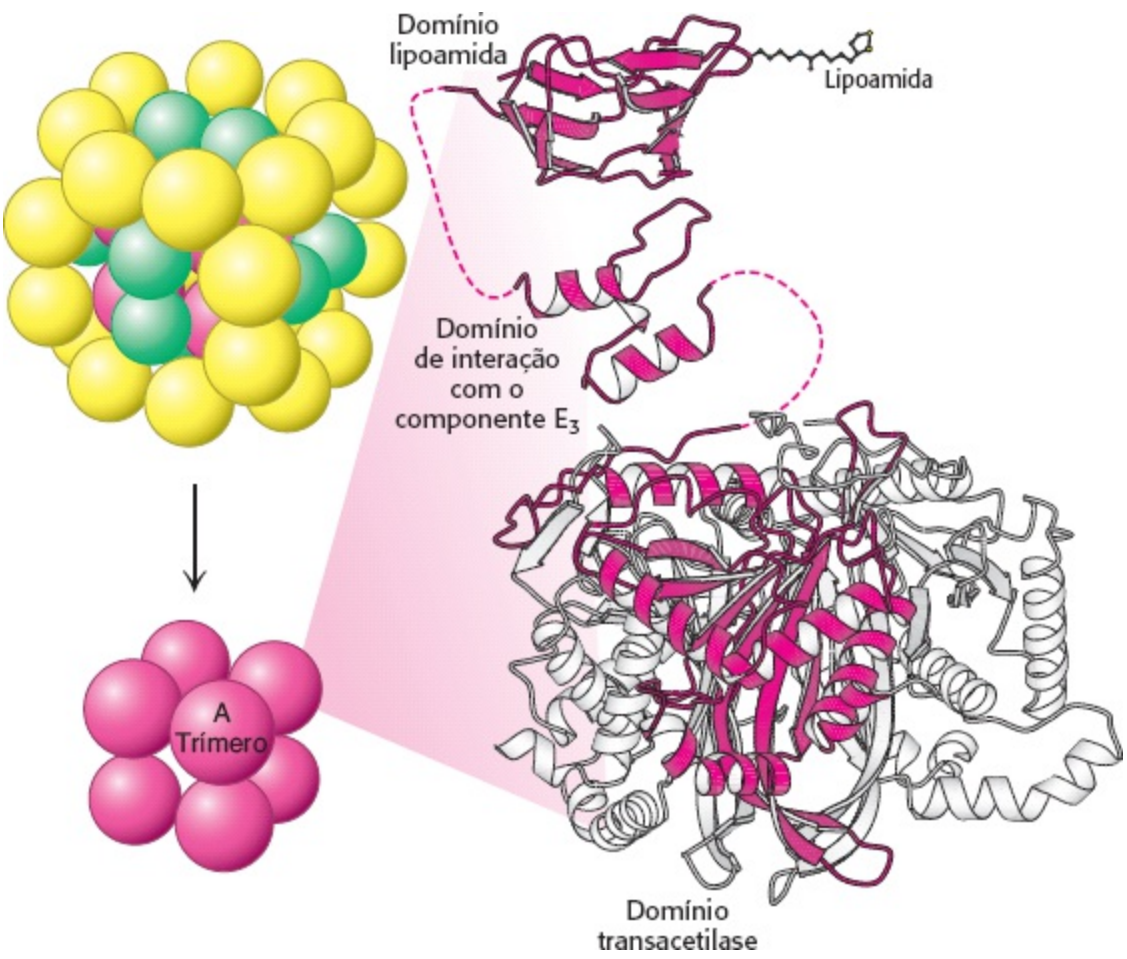


Figura 17.8 Estrutura do cerne da transacetilase (E_2). Cada bola vermelha representa um trímero de três subunidades E_2. *Observe* que cada subunidade é constituída por três domínios: um domínio de ligação com lipoamida, um domínio pequeno para interação com E_3 e um grande domínio catalítico transacetilase. O domínio transacetilase apresenta três subunidades idênticas, sendo uma delas mostrada em vermelho e duas em branco na representação em fita.

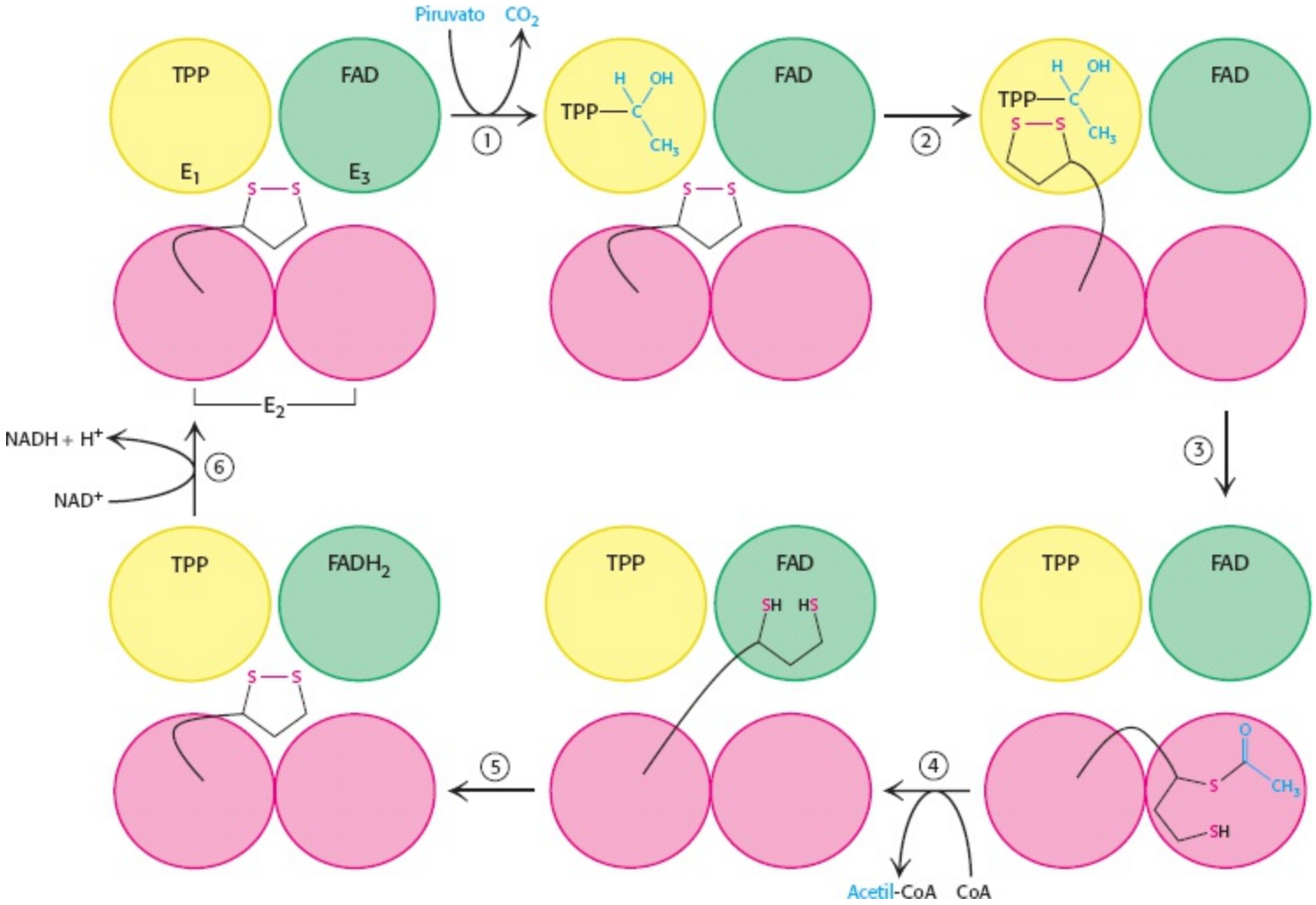


Figura 17.9 Reações do complexo piruvato desidrogenase. No alto (à esquerda), a enzima (representada por uma esfera amarela, uma esfera verde e duas esferas vermelhas) não é modificada e está pronta para um ciclo catalítico. (1) O piruvato é descarboxilado para formar hidroxietil-TPP. (2) O braço lipoamida de E_2 move-se para o sítio ativo de E_1. (3) E_1 catalisa a transferência do grupo com dois carbonos para o grupo lipoamida para formar o complexo acetil-lipoamida. (4) E_2 catalisa a transferência da parte acetila para CoA para formar o produto acetil-CoA. O braço di-hidrolipoamida move-se, então, para o sítio ativo de E_3. E_3 catalisa (5) a oxidação da di-hidrolipoamida e (6) a transferência dos prótons e elétrons para NAD^+ para completar o ciclo da reação.

2. E_2 insere o braço lipoamida do domínio lipoamida no canal profundo de E_1 que leva ao sítio ativo.

3. E_1 catalisa a transferência do grupo acetila para a lipoamida. O braço acetilado deixa então E_1 e entra no cubo de E_2 para seguir para o sítio ativo de E_2, localizado profundamente no cubo na interface da subunidade.

4. O grupo acetila é, então, transferido para CoA, e o segundo produto, acetil-CoA, deixa o cubo. O braço lipoamida reduzido move-se então para o sítio ativo da flavoproteína E_3.

5. No sítio ativo de E_3, a lipoamida é oxidada pela coenzima FAD. A lipoamida reativada está pronta para iniciar outro ciclo da reação.

6. O produto final, NADH, é produzido graças à reoxidação de $FADH_2$-FAD.

A integração estrutural de três tipos de enzimas e o braço lipoamida, longo e flexível, possibilitam a catálise coordenada de uma reação complexa. A proximidade das enzimas *aumenta*

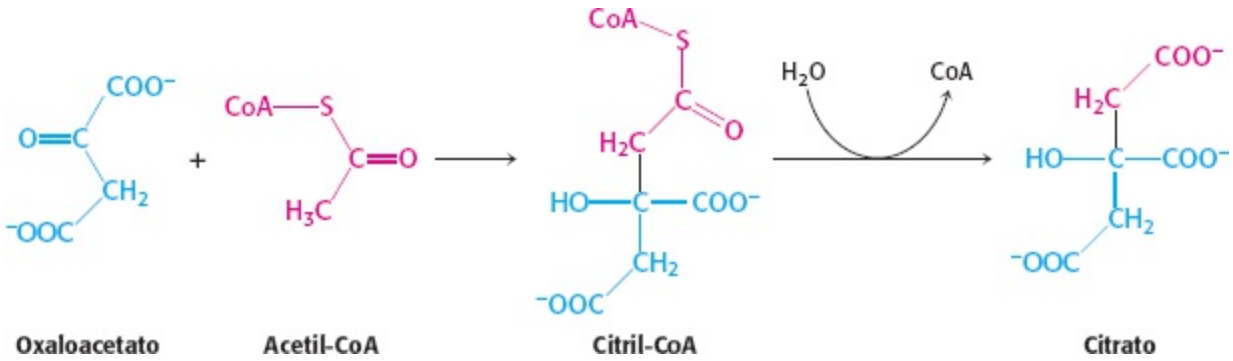
a velocidade total da reação e minimiza reações colaterais. Todos os intermediários da descarboxilação oxidativa do piruvato permanecem ligados ao complexo durante a sequência da reação e são prontamente transferidos à medida que o braço flexível de E_2 se instala progressivamente em cada sítio ativo.

17.2 O ciclo do ácido cítrico oxida duas unidades de carbono

A conversão do piruvato em acetil-CoA pelo complexo piruvato desidrogenase é o elo entre glicólise e a respiração celular visto que a *acetil-CoA é a fonte energética para o ciclo do ácido cítrico*. Na verdade, todas as fontes energéticas acabam sendo metabolizadas a acetil-CoA ou componentes do ciclo do ácido cítrico.

Citrato sintase forma citrato a partir de oxaloacetato e acetil coenzima A

O ciclo do ácido cítrico começa com a condensação de uma unidade de quatro carbonos, oxaloacetato, com uma unidade de dois carbonos, o grupo acetila da acetil-CoA. O oxaloacetato reage com acetil-CoA e H_2O, formando citrato e CoA.



Essa reação, que consiste em uma condensação aldol seguida por hidrólise, é catalisada pela *citrato sintase*. O oxaloacetato primeiro se condensa com acetil-CoA e forma *citril-CoA*, uma molécula rica em energia porque contém uma ligação tioéster oriunda da acetil-CoA. A hidrólise de citril-CoA tioéster em citrato e CoA impulsiona a reação global na direção da síntese de citrato. Em suma, a hidrólise do tioéster possibilita a síntese de uma nova molécula a partir de dois precursores.

Sintase
Enzima que catalisa uma reação de síntese na qual duas unidades são reunidas, geralmente sem a participação direta de ATP (ou outro nucleosídio trifosfato).

Mecanismo | O mecanismo da citrato sintase evita reações indesejáveis

Visto que a condensação de acetil-CoA e oxaloacetato inicia o ciclo do ácido cítrico, é muito importante minimizar as reações colaterais, sobretudo a hidrólise da acetil-CoA a acetato e CoA. Faremos a seguir uma breve consideração sobre como a citrato sintase evita a hidrólise ineficiente da acetil-CoA.

A citrato sintase dos mamíferos é um dímero de subunidades idênticas com 49 kDa. Cada sítio ativo está localizado em uma fenda entre o domínio grande e pequeno de uma subunidade, adjacente à interface da subunidade. Os estudos com cristalografia de raios X da citrato sintase e de seus complexos com vários substratos e inibidores revelaram que a enzima sofre grandes alterações conformacionais durante a catálise. A citrato sintase apresenta uma cinética sequencial ordenada: o oxaloacetato liga-se primeiro, seguido pela acetil-CoA. O motivo dessa ligação ordenada é que o *oxaloacetato induz uma importante mudança conformacional estrutural resultando na criação de um sítio de ligação para a acetil-CoA*. A ligação de oxaloacetato converte a forma aberta da enzima na forma fechada (Figura 17.10). Em cada subunidade o domínio pequeno gira 19° em relação ao domínio grande. *Movimentos de até 15 Å resultam da rotação das* α*-hélices* induzida por rotações mínimas das cadeias laterais em torno do oxaloacetato ligado. Essas alterações estruturais criam um sítio de ligação para a acetil-CoA. Essa transição conformacional evoca o fechamento da fenda na hexoquinase induzida pela ligação com a glicose (Seção 16.1).

A citrato sintase catalisa a reação de condensação ao aproximar os substratos, orientando-os e polarizando determinadas ligações (Figura 17.11). A doação e a retirada de prótons transformam a acetil-CoA em um *intermediário enol*. O enol "ataca" o oxaloacetato para formar a dupla ligação carbono-carbono que conecta a acetil-CoA com o oxaloacetato. A citril-CoA recém-formada induz mais alterações estruturais na enzima, fazendo com que o sítio ativo se torne completamente enclausurado. A enzima cliva o tioéster citril-CoA por meio de hidrólise. A CoA abandona a enzima, seguida pelo citrato, e a enzima retoma sua conformação aberta original.

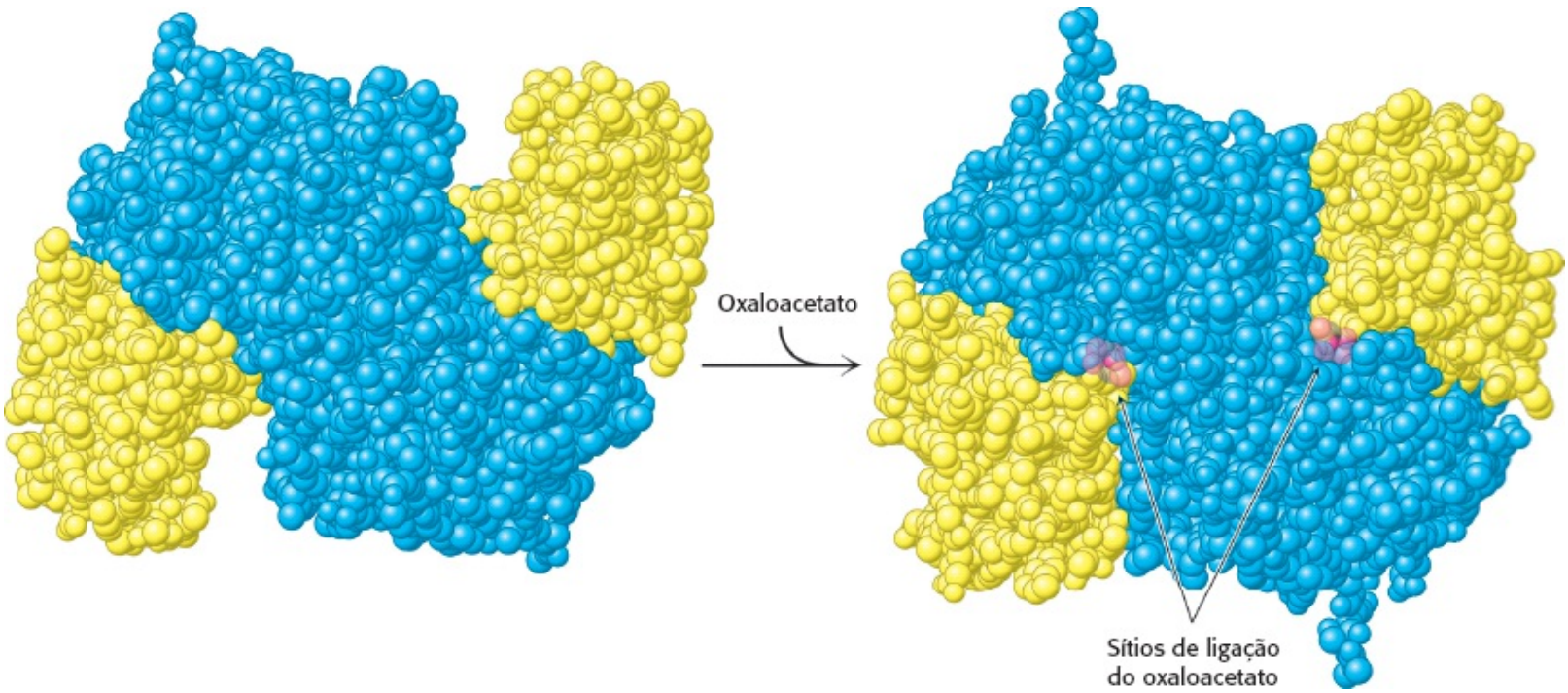


Figura 17.10 Alterações conformacionais na citrato sintase quando da ligação com oxaloacetato. O pequeno domínio de cada subunidade do homodímero é mostrado em amarelo, enquanto os domínios grandes são mostrados em azul. À esquerda, forma aberta da enzima isolada. À direita, forma fechada da enzima com ligantes. [Desenhada a partir de 5CSC.pdb e 4CTS.pdb.].

Agora conseguimos compreender como é evitada a hidrólise ineficiente de acetil-CoA. A citrato sintase é adequada para a hidrólise de *citril*-CoA, mas não de *acetil-CoA*. Como é feita essa distinção? Primeiro, a acetil-CoA só se liga à enzima depois que o oxaloacetato está acoplado e

pronto para a condensação. Segundo, os resíduos catalíticos cruciais para a hidrólise da ligação tioéster só estão posicionados adequadamente depois da formação de citril-CoA. Como ocorre com a hexoquinase e a triose fosfato isomerase (Seção 16.1), *o encaixe induzido evita uma reação colateral indesejável*.

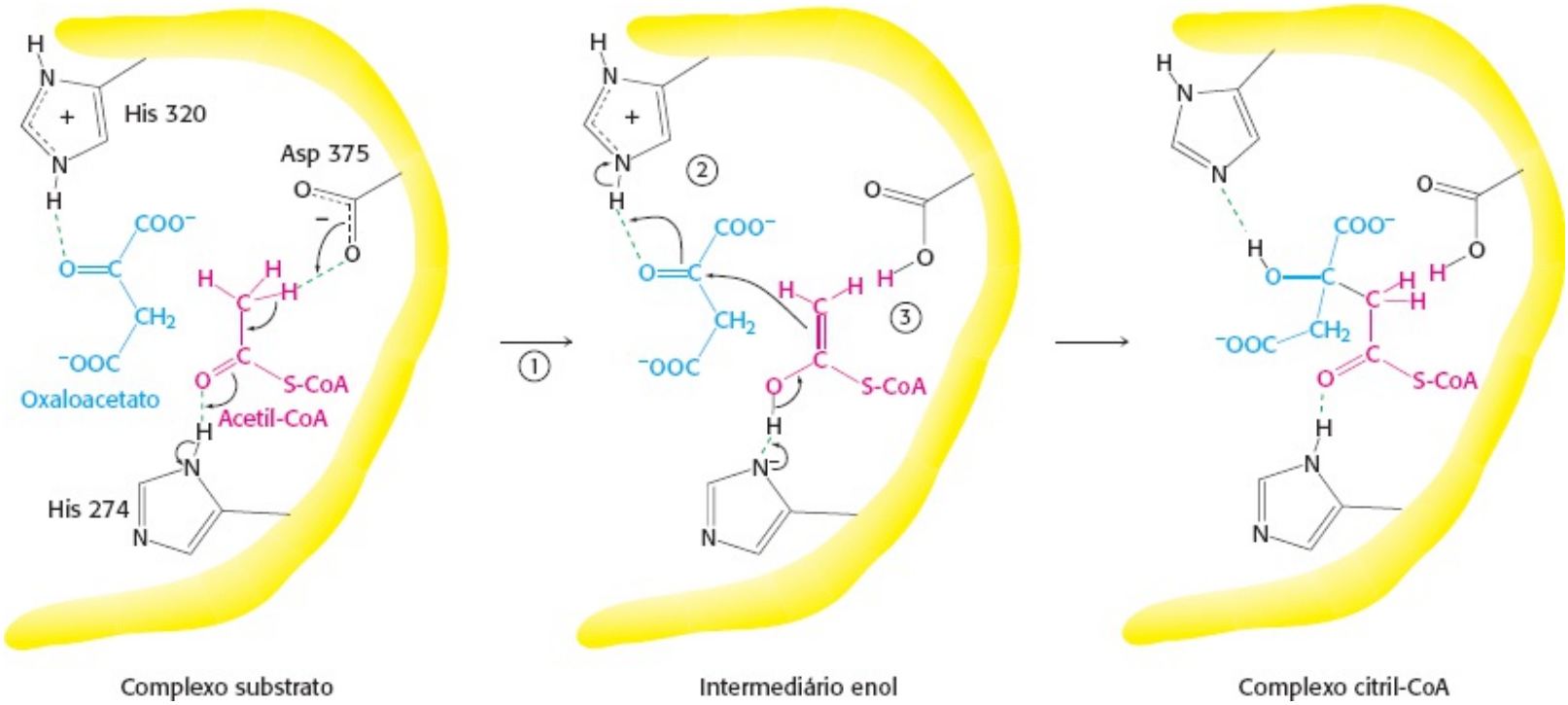
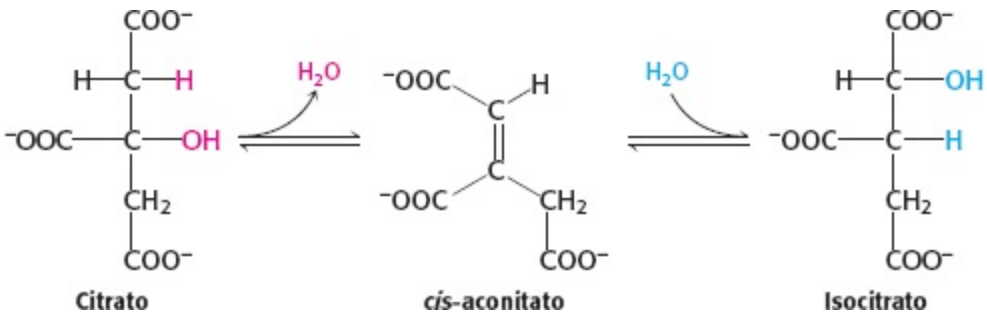


Figura 17.11 Mecanismo de síntese de citril-CoA pela citrato sintase. (1) No complexo substrato (à esquerda), His 274 doa um próton para o oxigênio carbonila de acetil-CoA para promover a retirada de um próton metila pelo Asp 375 formando um intermediário enol (centro). (2) O oxaloacetato é ativado pela transferência de um próton da His 320 para o seu átomo de carbono carbonil. (3) Simultaneamente o enol da acetil-CoA ataca o carbono carbonil do oxaloacetato formando uma ligação carbono-carbono ligando a acetil-CoA ao oxaloacetato. His 274 é reprotonada. Citril-CoA é formado. His 274 participa de novo como um doador de próton para hidrolisar o tioéster (não demonstrado), gerando citrato e CoA.

Citrato é isomerizado a isocitrato

O grupo hidroxila não está localizado apropriadamente no citrato para a descarboxilação oxidativa que ocorre subsequentemente. Assim sendo, o citrato é isomerizado a isocitrato para permitir que a unidade com seis carbonos sofra descarboxilação oxidativa. A isomerização do citrato é conseguida graças a uma etapa de *desidratação* seguida por uma etapa de *hidratação*. O resultado é a permuta de um H e um OH. A enzima catalisadora das duas etapas é denominada aconitase por causa de um intermediário *cisaconitato*.



A aconitase é uma *proteína ferro-enxofre* ou proteína *ferro não heme* porque contém ferro que não

está ligado a heme. Em vez disso, seus quatro átomos de ferro formam complexos com quatro sulfetos inorgânicos e três átomos de enxofre de cisteínas, deixando um átomo de ferro disponível para se ligar ao citrato por meio de um de seus grupos COO^- e um grupo OH (Figura 17.12). Esse *cluster* Fe-S participa na desidratação e na reidratação do substrato ligado.

Isocitrato é oxidado e descarboxilado a alfacetoglutarato

Analisemos agora a primeira de quatro reações de oxirredução no ciclo do ácido cítrico. A descarboxilação oxidativa do isocitrato é catalisada pela *isocitrato desidrogenase*.

$$\text{Isocitrato} + NAD^+ \rightarrow \alpha\text{-cetoglutarato} + CO_2 + NADH$$

O intermediário nessa reação é oxalossuccinato, um β-cetoácido instável. Enquanto ligado à enzima, perde CO_2 para formar α-cetoglutarato.

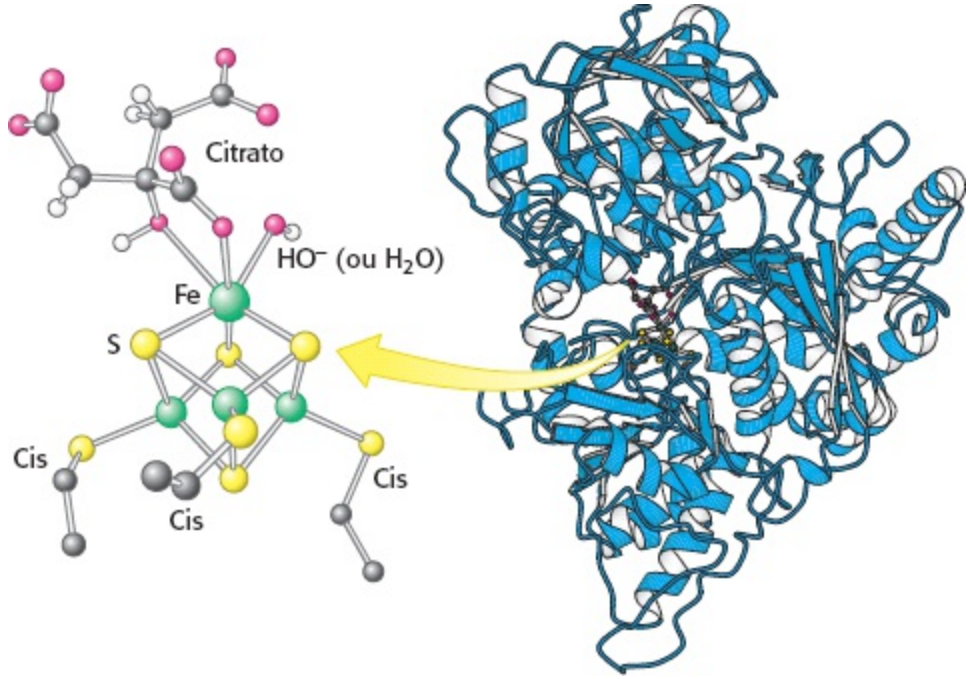
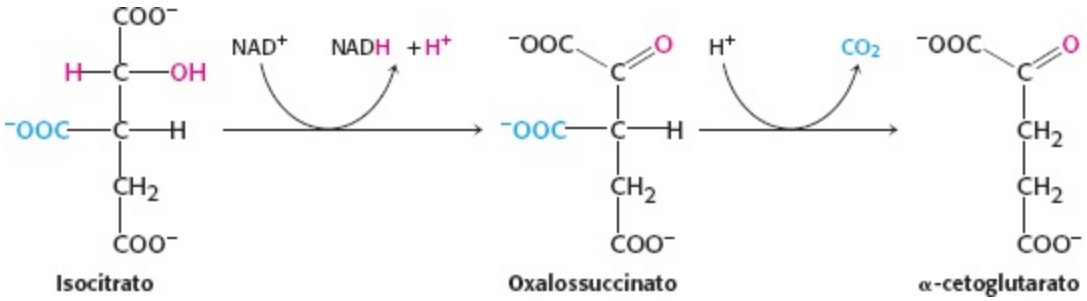


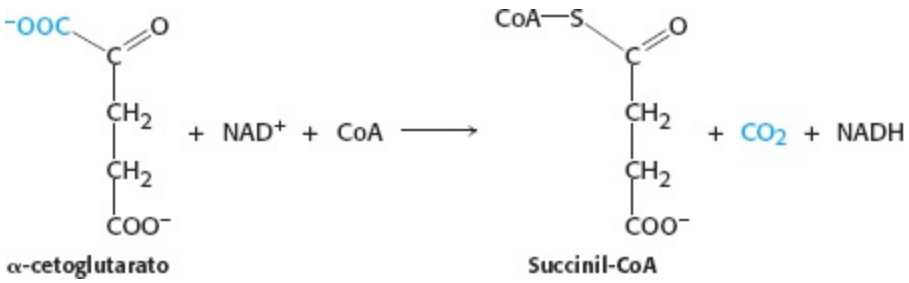
Figura 17.12 Ligação do citrato ao complexo ferro-enxofre da aconitase. Um *cluster* 4Fe-4S (ferro-enxofre) é um componente do sítio ativo da aconitase. Observe que um dos átomos de ferro do *cluster* se liga a um grupo COO^- e a um grupo OH do citrato. [Desenhada a partir de 1C96.pdb.].



A velocidade de formação de α-cetoglutarato é importante para se determinar a velocidade total do ciclo, como será discutido na página 518. Essa oxidação gera o primeiro carreador de elétrons com alto potencial de transferência, NADH, no ciclo.

Succinil coenzima A é formada pela descarboxilação oxidativa de alfacetoglutarato

A conversão de isocitrato em α-cetoglutarato é seguida por uma segunda reação de descarboxilação oxidativa, a formação de succinil-CoA a partir de α-cetoglutarato.



Essa reação é catalisada pelo *complexo α-cetoglutarato desidrogenase*, reunindo de forma organizada três tipos de enzimas de forma homóloga ao complexo piruvato desidrogenase. Na verdade, a descarboxilação oxidativa do α-cetoglutarato assemelha-se a do piruvato, que também é um α-cetoácido.

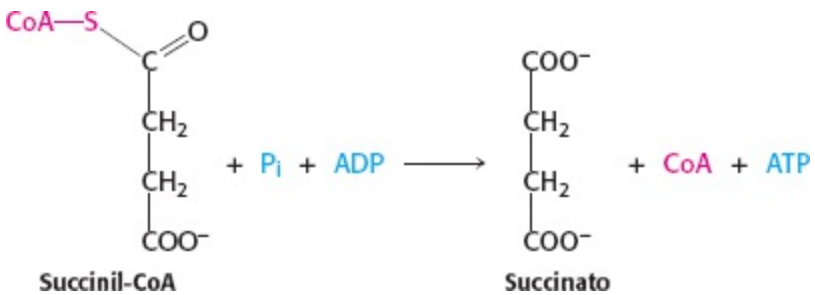
$$\text{Piruvato} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{complexo piruvato desidrogenase}} \text{acetil-CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$$

$$\alpha\text{-cetoglutarato} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{complexo } \alpha\text{-cetoglutarato desidrogenase}} \text{succinil-CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$$

As duas reações incluem a descarboxilação de um α-cetoácido e a subsequente formação de uma ligação tioéster com CoA que tem um alto potencial de transferência. Os mecanismos de reação são totalmente análogos (p. 504).

Um composto com alto potencial de transferência de fosforila é gerado a partir de succinil-coenzima A

Succinil-CoA é um composto tioéster rico em energia. Para a hidrólise de succinil-CoA $\Delta G^{o'}$ é cerca de –33,5 kJ mol^{-1} (–8,0 kcal mol^{-1}), o que é comparável ao da hidrólise do ATP (–30,5 kJ mol^{-1}, ou 7,3 kcal mol^{-1}). Na reação da citrato sintase, a clivagem da ligação tioéster fornece energia para a síntese do citrato com seis carbonos a partir do oxaloacetato com quatro carbonos e do fragmento com dois carbonos. *A clivagem da ligação tioéster do succinil-CoA é acoplado à fosforilação de um nucleosídeo purínico difosfato, frequentemente ADP.* Esta reação, que é prontamente reversível, é catalisada pela *succinil-CoA sintetase* (succinato tioquinase).



Essa reação é a única etapa no ciclo do ácido cítrico que produz diretamente um composto com alto potencial de transferência de fosforila. Nos mamíferos existem duas isoenzimas da enzima, uma

específica para ADP e outra para GDP. Nos tecidos com respiração celular significativa, como os músculos esqueléticos e o miocárdio, predomina a isoenzima que precisa de ADP. Nos tecidos com muitas reações anabólicas, como o fígado, é comum o achado da isoenzima que necessita de GDP. Acredita-se que a enzima que demanda GDP funcione no sentido oposto ao do ciclo de Krebs (ciclo do ácido tricarboxílico, TCA), ou seja, GDP potencializa a síntese de succinil-CoA, que é o precursor para a síntese do heme. A enzima de *E. coli* usa GDP e/ou ADP como aceptor de grupo fosforila.

Observe que a enzima *nucleosídio difosfoquinase*, que catalisa a seguinte reação,

$$GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP$$

possibilita que o grupo fosforila γ seja prontamente transferido de GTP para formar ATP e o ajuste da concentração de GTP ou ATP para atender às demandas das células.

Mecanismo | A succinil-coenzima A sintetase transforma tipos de energia bioquímica

O mecanismo dessa reação é um exemplo claro de transformação de energia: energia inerente na molécula tioéster é transformada em potencial de transferência de fosforila (Figura 17.13). A primeira etapa é o deslocamento da coenzima A pelo ortofosfato, que gera outro composto rico em energia, succinil fosfato. Um resíduo de histidina tem uma participação crucial destacando o grupo fosforila, transferindo-o para um nucleosídio difosfato ligado e formando um nucleosídio trifosfato. A participação de compostos de alta energia em todas as etapas é atestada pelo fato de que a reação é prontamente reversível: $\Delta G^{o'} = -3{,}4$ kJ mol^{-1} ($-0{,}8$ kcal mol^{-1}). A formação de ATP à custa de succinil-CoA é um exemplo de fosforilação ao nível de substrato.

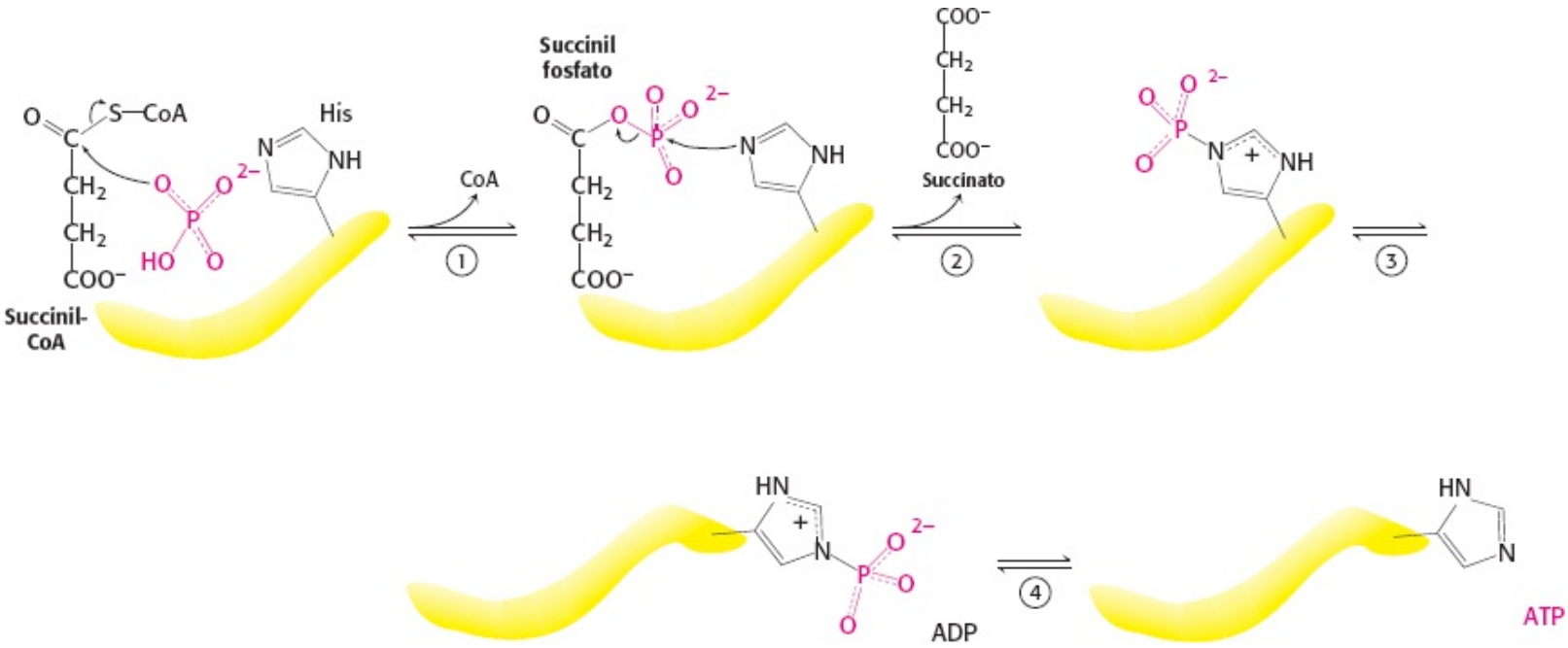


Figura 17.13 Mecanismo de reação da succinil-CoA sintetase. A reação prossegue por meio de um intermediário (enzima fosforilada). (1) Ortofosfato desloca a coenzima A, que gera outro composto rico em energia, o succinil fosfato. (2) Um resíduo de histidina remove o grupo fosforila com a concomitante geração de succinato e fosfo-histidina. (3) O resíduo fosfo-histidina gira para um nucleosídio fosfato ligado e (4) o grupo fosforila é transferido para formar o nucleosídio trifosfato.

A succinil-CoA sintetase é um heterodímero $\alpha_2\beta_2$, e a unidade funcional é um par αβ. O

mecanismo da enzima consiste em transferência do grupo fosforila primeiro para a succinil-CoA ligada na subunidade α e depois para um nucleosídio difosfato acoplado à subunidade β. O exame da estrutura tridimensional da succinil-CoA sintetase revela que cada subunidade compreende dois domínios (Figura 17.14). Os domínios aminoterminais das duas subunidades apresentam estruturas diferentes, e cada uma é característica de seu papel no mecanismo. O domínio aminoterminal da subunidade α forma um *Rossmann fold* (Seção 16.1), que se acopla ao ADP, substrato da succinil-CoA sintetase. O domínio aminoterminal da subunidade β é um domínio para captação de ATP, encontrado em muitas enzimas, que aqui se liga e ativa ADP. A succinil-CoA sintetase evoluiu ao adotar esses domínios e os aproveita para capturar a energia associada a clivagem da succinil-CoA, que é utilizada para impulsionar a geração de um nucleosídio trifosfato.

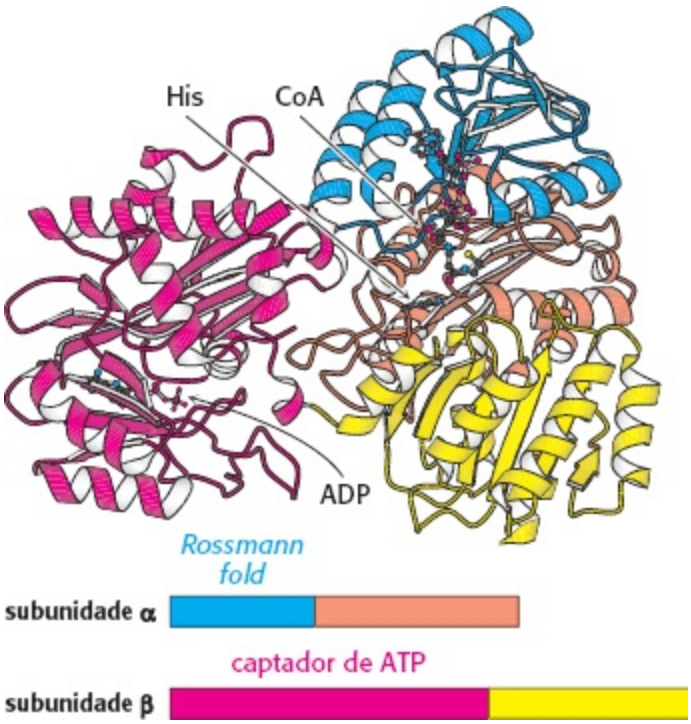
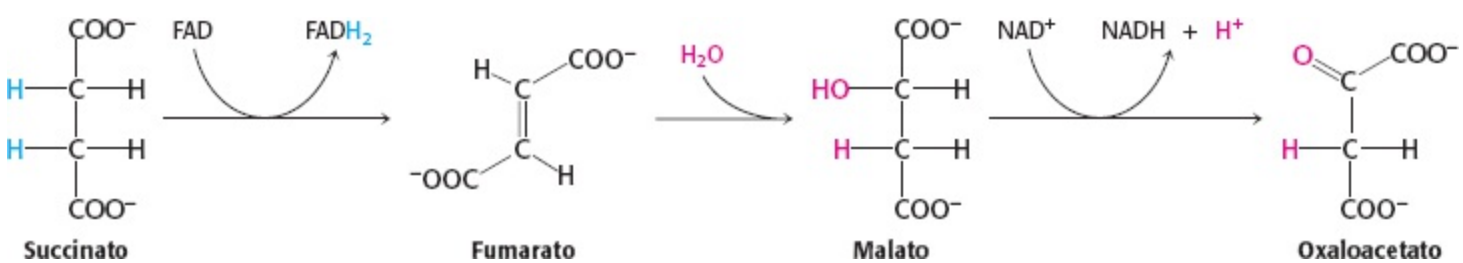


Figura 17.14 Estrutura da succinil-CoA sintetase. A enzima é constituída por duas subunidades. A subunidade α contém uma estrutura *Rossmann fold* que se conecta ao componente ADP da CoA e a subunidade β contém uma região ativadora de nucleotídios denominada domínio captador de ATP (*ATP-grasp*). Aqui observamos esse domínio aprisionando uma molécula de ADP. *Observe* que o resíduo de histidina se encontra entre a CoA e o ADP. Esse resíduo de histidina capta o grupo fosforila de perto da CoA e o transfere para o nucleotídio "preso" no domínio de captação de ATP. [Desenhada a partir de 1CGl.pdb.].

Oxaloacetato é regenerado pela oxidação do succinato

As reações dos compostos com quatro carbonos constituem o estágio final do ciclo do ácido cítrico: a regeneração do oxaloacetato.



As reações constituem um padrão metabólico que veremos de novo na síntese e degradação de

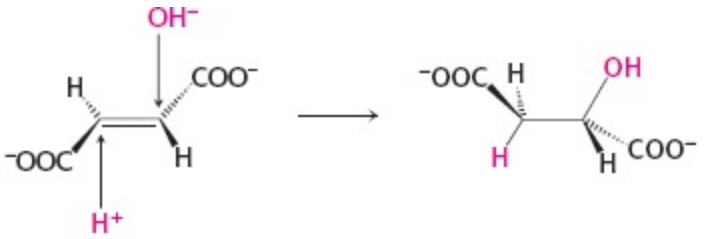
ácidos graxos, assim como na degradação de alguns aminoácidos. Um grupo metileno (CH_2) é convertido em um grupo carbonila (C=O) em três etapas: uma reação de oxidação, uma reação de hidratação e uma segunda reação de oxidação. O oxaloacetato é, portanto, regenerado para uma outra volta do ciclo e mais energia é extraída na forma de $FADH_2$ e NADH.

O succinato é oxidado a fumarato pela *succinato desidrogenase*. O aceptor de hidrogênio é FAD em vez de NAD^+, que é usado nas outras três reações de oxidação do ciclo. FAD é o aceptor de hidrogênio nessa reação porque a alteração da energia livre é insuficiente para reduzir NAD^+. FAD é quase sempre o aceptor de elétrons nas oxidações que removem dois átomos de hidrogênio de um substrato. Na succinato desidrogenase, o anel isoaloxazina do FAD está ligado covalentemente a uma cadeia lateral da histidina da enzima (designada E-FAD).

$$\text{E-FAD} + \text{succinato} \rightleftharpoons \text{E-FADH}_2 + \text{fumarato}$$

A succinato desidrogenase, como a aconitase, é uma proteína ferro-enxofre. Na verdade, a succinato desidrogenase contém três tipos diferentes de *clusters* ferro-enxofre: 2 Fe-2S (dois íons ferro ligados a dois sulfitos inorgânicos), 3Fe-4S e 4Fe-4S. A succinato desidrogenase – que consiste em uma subunidade com 70 kDa e uma subunidade de 27 kDa – difere de outras enzimas no ciclo do ácido cítrico por estar embebida na membrana mitocondrial interna. Na verdade, *a succinato desidrogenase está diretamente associada à cadeia de transporte de elétrons, o elo entre o ciclo do ácido cítrico e a formação de ATP.* $FADH_2$ produzido pela oxidação do succinato não se dissocia da enzima, ao contrário do NADH produzido em outras reações de oxirredução. Dois elétrons são transferidos do $FADH_2$ diretamente para os *clusters* de ferro-enxofre da enzima, que por sua vez passa os elétrons para a coenzima Q (CoQ). A coenzima Q, um membro importante da cadeia de transporte de elétrons, passa elétrons para o aceptor final, oxigênio molecular, como veremos no Capítulo 18.

A próxima etapa é a hidratação do fumarato para formar L-malato. A enzima fumarase catalisa um acréscimo estereoespecífico de H^+ e OH^- em *trans*. O grupo OH^- é adicionado a apenas um lado da dupla ligação do fumarato, portanto, apenas o isômero L do malato é formado.



Fumarato L-malato

Por fim, malato é oxidado para formar oxaloacetato. Essa reação é catalisada pela *malato desidrogenase,* e NAD^+ é, mais uma vez, o aceptor de hidrogênio.

$$\text{Malato} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{oxaloacetato} + \text{NADH} + H^+$$

A energia livre padrão para essa reação, ao contrário das outras etapas no ciclo do ácido cítrico, é significativamente positiva ($\Delta G^{o'}$ = + 29,7 kJ mol^{-1} ou + 7,1 kcal mol^{-1}). A oxidação do malato é impulsionada pelo uso dos produtos – oxaloacetato pela citrato sintase e NADH pela cadeia de transporte de elétrons.

O ciclo do ácido cítrico produz elétrons com elevado potencial de transferência, ATP e CO_2

A reação efetiva do ciclo do ácido cítrico é a seguinte

$$\text{Acetil-CoA} + 3\ NAD^+ + FAD + ADP + P_i + 2\ H_2O \rightarrow$$
$$2\ CO_2 + 3\ NADH + FADH_2 + ATP + 2\ H^+ + CoA$$

Recapitulemos as reações que resultam nessa estequiometria (Figura 17.15 e Tabela 17.2):

1. Dois átomos de carbono entram no ciclo na condensação de uma unidade acetila (proveniente de acetil-CoA) com oxaloacetato. Dois átomos de carbono deixam o ciclo na forma de CO_2 nas descarboxilações sucessivas catalisadas pela isocitrato desidrogenase e pela α-cetoglutarato desidrogenase.

2. Quatro pares de átomos de hidrogênio deixam o ciclo em quatro reações de oxidação. Duas moléculas de NAD^+ são reduzidas nas reações de descarboxilação oxidativa de isocitrato e α-cetoglutarato, uma molécula de FAD é reduzida na oxidação do succinato, e uma molécula de NAD^+ é reduzida na oxidação do malato. É preciso lembrar que a molécula de NAD^+ é reduzida na descarboxilação oxidativa do piruvato para formar acetil-CoA.

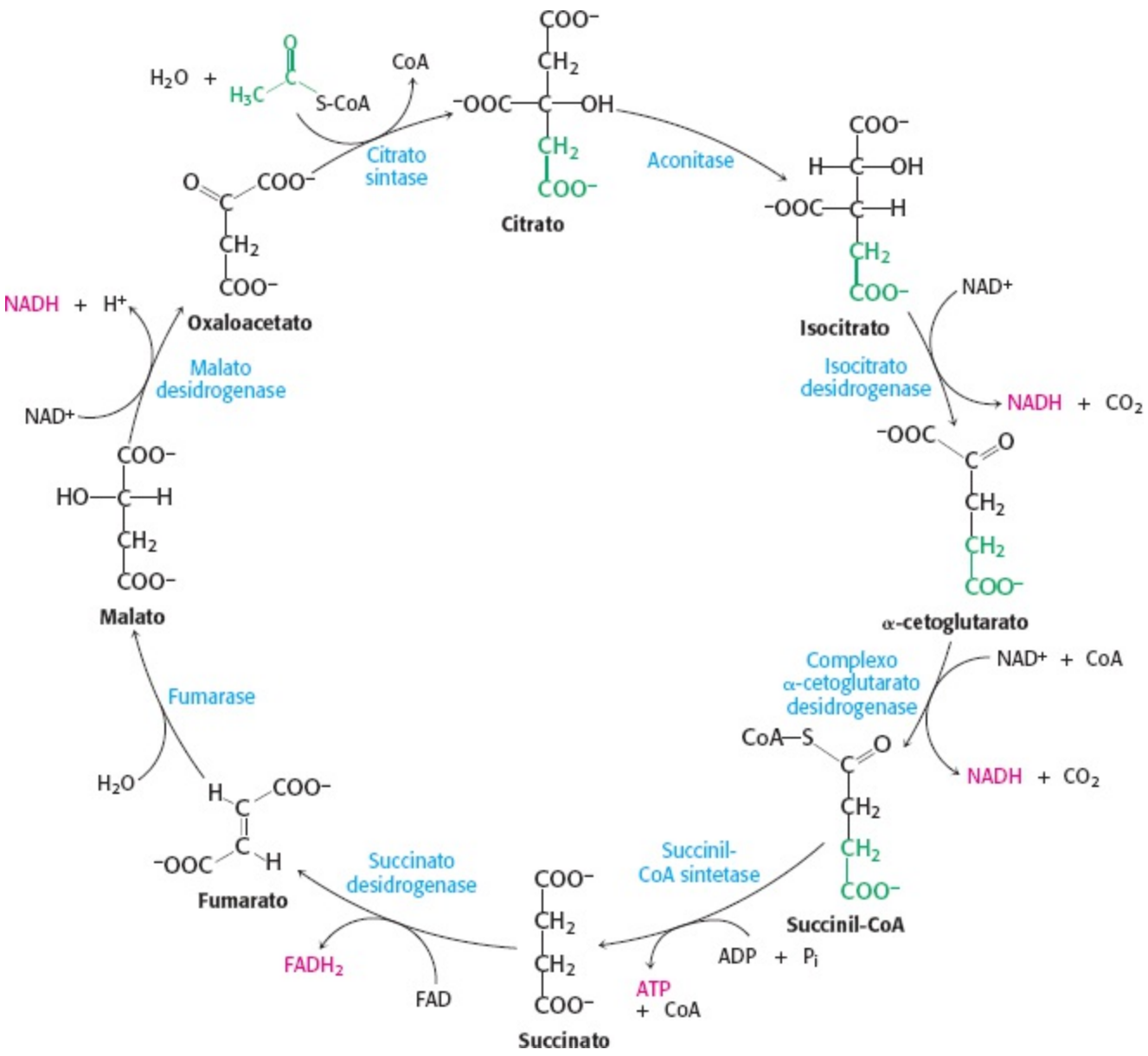


Figura 17.15 Ciclo do ácido cítrico. Visto que o succinato é uma molécula simétrica, a identidade dos carbonos provenientes da unidade acetila é perdida.

Tabela 17.2 Ciclo do ácido cítrico.

Etapa	Reação	Enzima	Grupo prostético	Tipo*	ΔGo′	
					kJ mol^{-1}	kcal mol^{-1}
1	Acetil-CoA + oxaloacetato + H_2O → citrato + CoA + H^+	Citrato sintase		a	−31,4	−7,5
2a	Citrato ⇌ Cis-aconitato + H_2O	Aconitase	Fe-S	b	+8,4	+2,0
2b	Cis-aconitato + H_2O ⇌ isocitrato	Aconitase	Fe-S	c	−2,1	−0,5
3	Isocitrato + NAD^+ ⇌ α-cetoglutarato + CO_2 + NADH	Isocitrato desidrogenase		d + e	−8,4	−2,0
4	α-cetoglutarato + NAD^+ + CoA	Complexo α-cetoglutarato desidrogenase	Ácido lipoico, FAD, TPP	d + e	−30,1	−7,2

	$\rightleftharpoons$ succinil-CoA + CO_2 + NADH					
5	Succinil-CoA + P_i + ADP $\rightleftharpoons$ succinato + ATP + CoA	Succinil-CoA sintetase		f	−3,3	−0,8
6	Succinato + FAD (ligado a enzima) $\rightleftharpoons$ fumarato + $FADH_2$ (ligado a enzima)	Succinato desidrogenase	FAD, Fe-S	e	0	0
7	Fumarato + H_2O $\rightleftharpoons$ L-malato	Fumarase		c	−3,8	−0,9
8	L-malato + NAD+ $\rightleftharpoons$ oxaloacetato + NADH + H+	Malato desidrogenase		e	+29,7	+7,1

*Tipo de reação: (a) condensação; (b) desidratação; (c) hidratação; (d) descarboxilação; (e) oxidação; (f) fosforilação ao nível de substrato.

3. Um composto com alto potencial de transferência de fosforila, geralmente ATP, é gerado a partir da clivagem da ligação tioéster na succinil-CoA.

4. Duas moléculas de água são consumidas: uma na síntese de citrato pela hidrólise de citril-CoA e a outra na hidratação do fumarato.

Estudos de marcação isotópica revelaram que os dois átomos de carbono que entram em cada ciclo não são os mesmos que saem. Os dois átomos de carbono que entram no ciclo na forma de grupo acetila são retidos durante as duas reações iniciais de descarboxilação (Figura 17.15) e permanecem incorporados nos ácidos com quatro carbonos do ciclo. Observe que o succinato é uma molécula simétrica. Por conseguinte, os dois átomos de carbono que entram no ciclo conseguem ocupar quaisquer posições de carbono no metabolismo subsequente dos ácidos com quatro carbonos. Os dois carbonos que entram no ciclo na forma de grupo acetila são liberados como CO_2 nas reações subsequentes do ciclo. Para compreender melhor o motivo pelo qual o citrato não é processado como uma molécula simétrica, veja as Questões 27 e 28.

Há cada vez mais evidências de que as enzimas do ciclo do ácido cítrico estão fisicamente associadas entre si. O arranjo próximo das enzimas aumenta a eficiência do ciclo do ácido cítrico porque um produto da reação consegue passar diretamente de um sítio ativo para o seguinte através de canais de conexão, um processo denominado *canalização de substrato (substrate channeling)*. O termo *metabolon* foi sugerido para descrever esses complexos multienzimáticos.

Como será descrito no Capítulo 18, a cadeia de transporte de elétrons oxida o NADH e o $FADH_2$ formados no ciclo do ácido cítrico. A transferência de elétrons desses carreadores para o O_2, o aceptor final de elétrons, resulta na geração de um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna. Essa força próton-motora impulsiona a geração de ATP; a estequiometria efetiva é de aproximadamente 2,5 ATP por NADH e 1,5 ATP por $FADH_2$. Assim sendo, nove grupos fosforila com elevado potencial de transferência são gerados quando a cadeia de transporte de elétrons oxida 3 NADH e 1 $FADH_2$ e um grupo fosforila com elevado potencial de transferência é diretamente formado em uma volta do ciclo do ácido cítrico. Uma unidade acetila gera aproximadamente 10 moléculas de ATP. Em grande contraste, a glicólise anaeróbica de 1 molécula de glicose gera apenas 2 moléculas de ATP (e 2 moléculas de lactato).

É preciso lembrar que oxigênio molecular não participa diretamente do ciclo do ácido cítrico. Todavia, o ciclo opera apenas em condições aeróbicas porque NAD^+ e FAD podem ser regenerados na mitocôndria apenas pela transferência de elétrons para oxigênio molecular. *A glicólise pode ser aeróbica ou anaeróbica, enquanto o ciclo do ácido cítrico é estritamente aeróbico*. A glicólise pode ocorrer em condições anaeróbicas porque NAD^+ é regenerado na conversão de piruvato em lactato ou etanol.

17.3 A entrada no ciclo do ácido cítrico e o metabolismo por meio dele são controlados

O ciclo do ácido cítrico é a via metabólica comum final para a oxidação aeróbica das moléculas energéticas. Além disso, como veremos na Seção 17.4 e repetidas vezes em nosso estudo da bioquímica, o ciclo é uma fonte importante de elementos estruturais para inúmeras biomoléculas importantes. Visto que é o eixo metabólico da célula, a entrada no ciclo do ácido cítrico e a velocidade do próprio ciclo são controladas em vários estágios.

O complexo piruvato desidrogenase é regulado alostericamente e por fosforilação reversível

Como já foi mencionado, a glicose pode ser formada a partir de piruvato (Seção 16.3). *Todavia, a formação de acetil-CoA a partir de piruvato é uma etapa irreversível nos animais e eles não conseguem converter acetil-CoA de novo em glicose*. A descarboxilação oxidativa do piruvato a acetil-CoA faz com que os átomos de carbono da glicose tenham um de dois destinos: oxidação a CO_2 pelo ciclo do ácido cítrico, com geração concomitante de energia, ou incorporação a lipídios (Figura 17.16). Como seria esperado de uma enzima em um ponto crítico no metabolismo, a atividade do complexo piruvato desidrogenase é meticulosamente controlada. Concentrações elevadas de produtos de reação inibem a reação: acetil-CoA inibe o componente transacetilase (E_2) por ligação direta, enquanto NADH inibe a di-hidrolipoil desidrogenase (E_3). Concentrações elevadas de NADH e acetil-CoA "informam" a enzima que as demandas energéticas da célula foram atendidas ou que ácidos graxos estão sendo degradados para produzir NADH e acetil-CoA. Em ambos os casos, não há mais necessidade de se metabolizar o piruvato a acetil-CoA. Essa inibição poupa glicose porque a maior parte do piruvato é obtido de glicose por meio de glicólise (Seção 16.1).

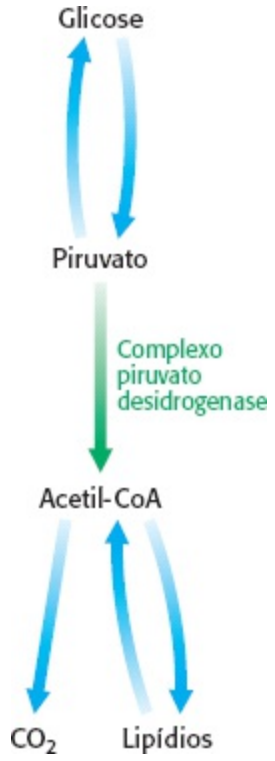


Figura 17.16 Da glicose a acetil-CoA. A síntese de acetil-CoA pelo complexo piruvato desidrogenase é uma etapa crucial irreversível no metabolismo da glicose.

O modo de regulação crucial do complexo nos eucariotos é a modificação covalente (Figura 17.17). *A fosforilação do componente piruvato desidrogenase (E_1) pela piruvato desidrogenase quinase I (PDK) desativa o complexo. A desativação é revertida pela piruvato desidrogenase fosfatase* (PDP). A quinase está associada ao componente transacetilase (E_2), mais uma vez realçando a importância estrutural e mecânica dessa cerne. Tanto a quinase como a fosfatase são reguladas. Para compreender como essa regulação atua em condições biológicas, considere o músculo que está se tornando ativo após um período de repouso (Figura 17.18). Em repouso o músculo não tem demandas energéticas significativas. Consequentemente, as razões NADH/NAD^+, acetil-CoA/CoA e ATP/ADP serão elevadas. Essas razões elevadas promovem fosforilação e desativação do complexo piruvato desidrogenase. Em outras palavras, concentrações elevadas de produtos imediatos (acetil-CoA e NADH) e de produto final (ATP) inibem a atividade. Portanto, *a piruvato desidrogenase é inativada quando a carga energética está elevada.*

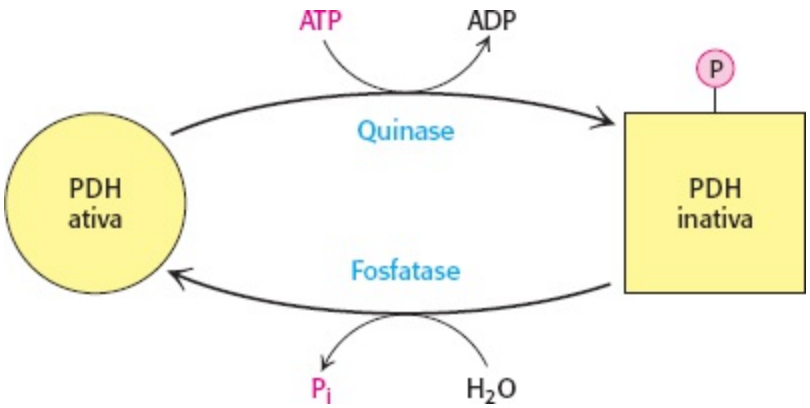


Figura 17.17 Regulação do complexo piruvato desidrogenase. Uma quinase específica fosforila e inativa a piruvato desidrogenase (PHD) e uma fosfatase ativa a desidrogenase ao remover o grupo fosforila. A quinase e a fosfatase também são enzimas extremamente bem reguladas.

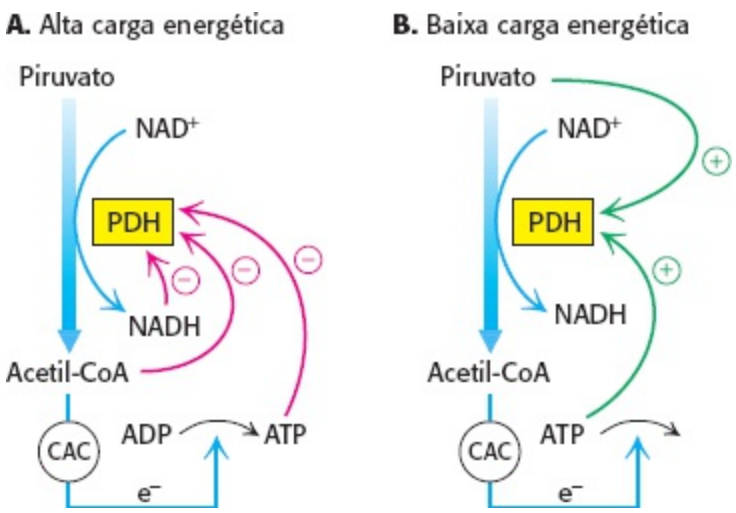


Figura 17.18 Resposta do complexo piruvato desidrogenase à carga energética. O complexo piruvato desidrogenase é regulado de modo a responder à carga energética da célula. **A.** O complexo é inibido por seus produtos imediatos, NADH e acetil-CoA, bem como pelo produto final da respiração celular, ATP. **B.** O complexo é ativado por piruvato e ADP, que inibem a quinase que fosforila PDH.

Quando o exercício físico começa, as concentrações de ADP e piruvato se elevam enquanto a contração muscular consome ATP e glicose é convertida em piruvato para atender às demandas energéticas. Tanto o ADP como o piruvato ativam a desidrogenase por meio de inibição da quinase. Além disso, a fosfatase é estimulada pelo Ca^{2+}, o mesmo sinal que inicia a contração muscular. A elevação do nível citoplasmático de Ca^{2+} (Seção 35.2) aumenta o nível mitocondrial de Ca^{2+}. A elevação do nível citoplasmático de Ca^{2+} ativa a fosfatase, incrementando a atividade da piruvato desidrogenase.

Em alguns tecidos, a fosfatase é regulada por hormônios. No fígado a epinefrina se liga ao receptor alfa-adrenérgico para iniciar a via do fosfatidilinositol (Seção 14.1), provocando aumento da concentração de Ca^{2+} que ativa a fosfatase. Nos tecidos capazes de sintetizar ácidos graxos, como o fígado e o tecido adiposo, a insulina (o hormônio que significa o estado alimentado) estimula a fosfatase e aumenta a conversão de piruvato em acetil-CoA. A acetil-CoA é o precursor da síntese de ácidos graxos (Seção 22.4). Nesses tecidos, o complexo piruvato desidrogenase é ativado para canalizar glicose em piruvato, depois em acetil-CoA e, por fim, em ácidos graxos.

Nas pessoas com deficiência de fosfatase, a enzima piruvato desidrogenase sempre está fosforilada e, portanto, inativa. Por conseguinte, a glicose é processada a lactato e não a acetil-CoA. Essa condição resulta em acidose láctica persistente, ou seja, níveis sanguíneos elevados de ácido láctico. Nesse ambiente ácido, muitos tecidos não funcionam bem, sobretudo o sistema nervoso central.

O ciclo do ácido cítrico é controlado em vários pontos

A velocidade do ciclo do ácido cítrico é ajustada, com precisão, de modo a atender às demandas de ATP das células animais (Figura 17.19). Os pontos de controle primários são as enzimas alostéricas isocitrato desidrogenase e α-cetoglutarato desidrogenase, as duas primeiras enzimas no ciclo a gerar elétrons de alta energia.

O primeiro sítio de controle é a isocitrato desidrogenase. Essa enzima é estimulada

alostericamente por ADP, que incrementa a afinidade da isocitrato desidrogenase por seus substratos. A ligação de isocitrato, NAD^+, Mg^{2+} e ADP é mutuamente cooperativa. Em contrapartida, ATP é inibitório. O produto da reação NADH também inibe a isocitrato desidrogenase ao deslocar diretamente NAD^+. É importante mencionar que várias etapas no ciclo exigem NAD^+ ou FAD, que são abundantes apenas quando a carga energética está baixa.

Um segundo sítio de controle do ciclo do ácido cítrico é a α-cetoglutarato desidrogenase. Alguns aspectos do controle dessa enzima são semelhantes ao do complexo piruvato desidrogenase, como se poderia esperar pela homologia dessas duas enzimas. A α-cetoglutarato desidrogenase é inibida pela succinil-CoA e pelo NADH, os produtos da reação por ela catalisada. Além disso, a α-cetoglutarato desidrogenase é inibida por uma carga energética alta. Portanto, *a velocidade do ciclo é reduzida quando a célula tem níveis elevados de ATP.*

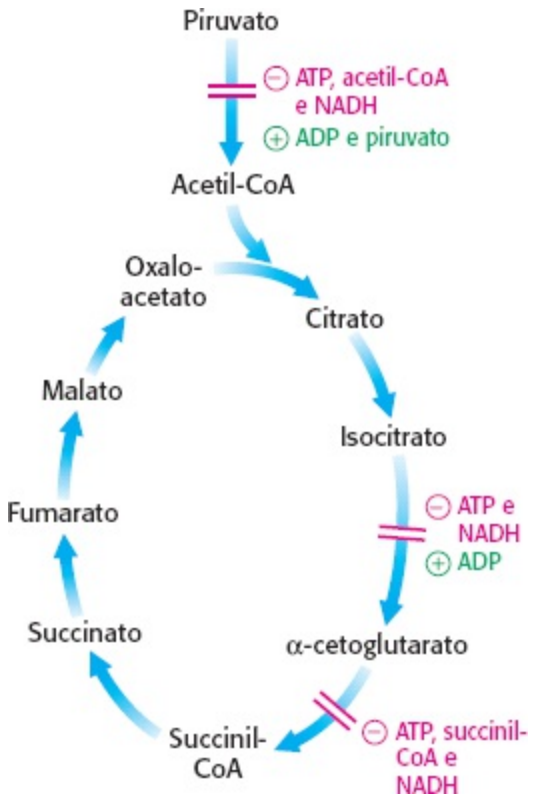


Figura 17.19 Controle do ciclo do ácido cítrico. O ciclo do ácido cítrico é regulado basicamente pela concentração de ATP e NADH. Os pontos de controle essenciais são as enzimas isocitrato desidrogenase e α-cetoglutarato desidrogenase.

O uso da isocitrato desidrogenase e α-cetoglutarato desidrogenase como pontos de controle integra o ciclo do ácido cítrico com outras vias metabólicas e realça o papel central do ciclo do ácido cítrico no metabolismo. Por exemplo, a inibição da isocitrato desidrogenase resulta em acúmulo de citrato, porque a interconversão de isocitrato e citrato é prontamente reversível em condições intracelulares. O citrato pode ser transportado para o citoplasma, onde sinaliza para a fosfofrutoquinase interromper a glicólise (Seção 16.2) e onde pode servir como fonte de acetil-CoA para a síntese de ácidos graxos (Seção 22.4). O α-cetoglutarato, que se acumula quando é inibida a enzima α-cetoglutarato desidrogenase, pode ser utilizado como precursor de vários aminoácidos e bases purínicas (Capítulo 23 e Capítulo 25).

Em muitas bactérias, a canalização dos fragmentos com dois carbonos para o ciclo também é controlada. *A síntese de citrato a partir de oxaloacetato e acetil-CoA é um ponto de controle importante nesses organismos*. O ATP é um inibidor alostérico da citrato sintase. O efeito do ATP

consiste em aumentar o valor de K_M para acetil-CoA. Por conseguinte, quando o nível de ATP aumenta, menos dessa enzima é saturada com acetil-CoA e menos citrato é formado.

Defeitos no ciclo do ácido cítrico contribuem para o desenvolvimento de câncer

Três enzimas cruciais à respiração celular sabidamente contribuem para o desenvolvimento do câncer: succinato desidrogenase, fumarase e piruvato desidrogenase quinase. Mutações que modificam a atividade das três enzimas incrementam a glicólise aeróbica. Na glicólise aeróbica, as células cancerosas metabolizam preferencialmente glicose a lactato mesmo na presença de oxigênio. Defeitos nas três enzimas compartilham um elo bioquímico comum: o fator de transcrição denominado *fator indutor de hipoxia 1* (HIF-1).

Normalmente, HIF-1 suprarregula as enzimas e os transportadores que incrementam a glicólise apenas quando a concentração de oxigênio cai, uma condição denominada hipoxia. Em condições normais, HIF-1 é hidroxilado pela enzima prolil-hidroxilase 2 e, subsequentemente, destruído pelo proteossoma, um grande complexo de enzimas proteolíticas (Capítulo 23). A degradação de HIF-1 impede a estimulação da glicólise. A enzima prolil-hidroxilase 2 demanda α-cetoglutarato, ascorbato e oxigênio para sua atividade. Assim sendo, quando a concentração de oxigênio cai, a prolil-hidroxilase 2 está inativa, HIF-1 não é hidroxilado nem degradado, e a síntese de proteínas necessárias para a glicólise é estimulada. Como resultado disso, a taxa de glicólise aumenta.

Os defeitos nas enzimas do ciclo do ácido cítrico influenciam significativamente a regulação da prolil-hidroxilase 2. Quando há defeitos na succinato desidrogenase ou na fumarase, succinato e fumarato se acumulam nas mitocôndrias e "extravasam" para o citoplasma. Tanto o succinato como o fumarato são inibidores competitivos da prolil-hidroxilase 2. A inibição da prolil-hidroxilase 2 resulta na estabilização do HIF-1 visto que este deixa de ser hidroxilado. Lactato, o produto final da glicólise, também parece inibir a prolil-hidroxilase 2 ao interferir na ação do ascorbato. Além de aumentar a quantidade de proteínas necessárias para a glicólise, o HIF-1 estimula a produção da piruvato desidrogenase quinase (PDK). A quinase inibe o complexo piruvato desidrogenase, evitando a conversão do piruvato em acetil-CoA. O piruvato permanece no citoplasma, aumentando ainda mais a velocidade da glicólise aeróbica. Além disso, mutações da PDK que resultam em incremento da atividade contribuem para o aumento da glicólise aeróbica e o subsequente desenvolvimento de câncer. O incremento da glicólise e a elevação progressiva da concentração de lactato induzido por mutações na PDK resultam em inibição da hidroxilase e estabilização do HIF-1.

Essas observações, que associam as enzimas do ciclo do ácido cítrico ao câncer, sugerem que o câncer também é uma doença metabólica, e não apenas consequência de fatores do crescimento mutantes e alterações das proteínas de controle do ciclo celular. A descoberta de que existe um componente metabólico no câncer abre novas possibilidades para se pensar no controle do câncer. Na verdade, experimentos preliminares sugerem que se as células cancerosas submetidas a glicólise aeróbica forem forçadas, por manipulação farmacológica, a usar fosforilação oxidativa, elas perderão suas propriedades malignas. Também é interessante mencionar que o ciclo do ácido cítrico, que é estudado há várias décadas, ainda guarda segredos a serem desvendados pelos futuros bioquímicos.

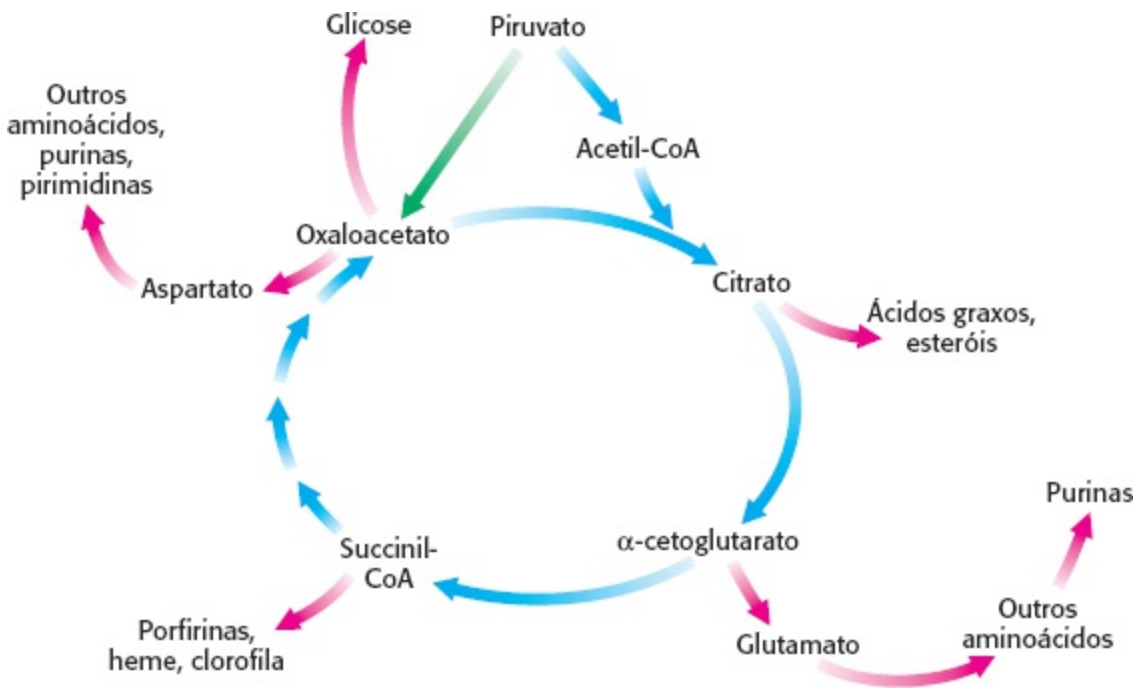


Figura 17.20 Funções biossintéticas do ciclo do ácido cítrico. Os intermediários são desviados para biossíntese (setas vermelhas) quando as demandas energéticas da célula são atendidas. Os intermediários são repostos pela formação de oxaloacetato a partir de piruvato.

17.4 O ciclo do ácido cítrico é uma fonte de precursores da biossíntese

Até agora concentramos nossa discussão no ciclo do ácido cítrico como *a principal via de degradação para a geração de ATP*. Como um importante eixo metabólico da célula, o ciclo do ácido cítrico também *proporciona intermediários para a biossíntese* (Figura 17.20). Por exemplo, a maioria dos átomos de carbono nas porfirinas provém da *succinil-CoA*. Muitos dos aminoácidos são derivados de α-*cetoglutarato* e *oxaloacetato*. Esses processos de biossíntese serão abordados nos próximos capítulos.

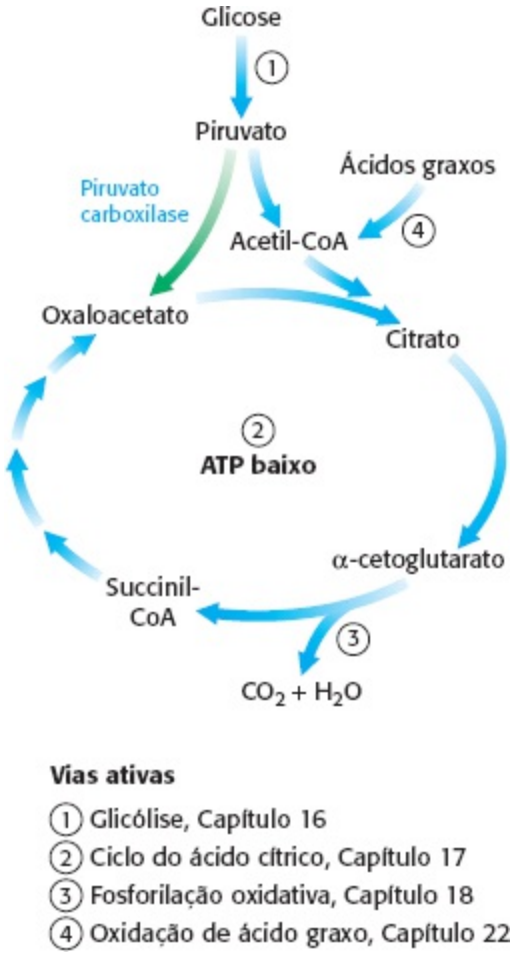


Figura 17.21 Integração de vias: vias ativas durante exercício físico após uma noite de repouso. A velocidade do ciclo do ácido cítrico aumenta durante os exercícios físicos, exigindo a reposição de oxaloacetato e acetil-CoA. O oxaloacetato é reposto por sua formação a partir de piruvato. Acetil-CoA é produzida a partir do metabolismo do piruvato e dos ácidos graxos.

É imprescindível que o ciclo do ácido cítrico tenha a capacidade de ser recomposto rapidamente

O ponto importante agora é que *os intermediários do ciclo do ácido cítrico precisam ser recompostos se forem usados em reações de biossíntese*. Suponha que muito oxaloacetato é convertido em aminoácidos para a síntese de proteínas e, posteriormente, aumenta a demanda de energia da célula. O ciclo do ácido cítrico é menos ativo a menos que seja formado novo oxaloacetato, porque a acetil-CoA não consegue entrar no ciclo a menos que seja condensada com oxaloacetato. Mesmo que o oxaloacetato seja reciclado, um nível mínimo tem de ser mantido para permitir que o ciclo funcione.

Como o oxaloacetato é reposto? Os mamíferos não têm as enzimas para a conversão efetiva de acetil-CoA em oxaloacetato ou em qualquer outro intermediário do ciclo do ácido cítrico. Na verdade, o oxaloacetato é formado pela carboxilação de piruvato, em uma reação catalisada pela enzima biotina-dependente *piruvato carboxilase* (Figura 17.21).

$$\text{Piruvato} + CO_2 + \text{ATP} + H_2O \rightarrow \text{oxaloacetato} + \text{ADP} + P_i + 2\ H^+$$

É preciso lembrar que essa enzima é crucial na gliconeogênese (Seção 16.3). É ativa apenas na presença de acetil-CoA, o que significa que há necessidade de mais oxaloacetato. Se a carga de energia for elevada, o oxaloacetato é convertido em glicose. Se a carga de energia for baixa, o

oxaloacetato repõe o ciclo do ácido cítrico. A síntese de oxaloacetato pela carboxilação de piruvato é um exemplo de reação anaplerótica (do grego, "preencher"), uma reação que resulta em síntese efetiva, ou reposição dos componentes da via. Observe que o ciclo do ácido cítrico pode ser recomposto pela geração de quaisquer dos intermediários.

A interrupção do metabolismo do piruvato é a causa de beribéri e de envenenamento por mercúrio e arsênico

Beribéri, um distúrbio cardiovascular e neurológico, é causado pela deficiência dietética de tiamina (também denominada vitamina B_1). Esta enfermidade foi e continua sendo um problema de saúde importante no Extremo Oriente porque o arroz, o principal alimento nessa região, tem um teor relativamente baixo de tiamina. Essa deficiência é parcialmente aliviada se os grãos de arroz integral forem colocados de molho em água antes da moagem – parte da tiamina nas cascas penetra no arroz. O problema é agravado se o arroz for polido (ou seja, convertido de arroz integral em arroz branco) porque apenas a camada externa contém teores significativos de tiamina. O beribéri também ocorre em alcoólatras com desnutrição grave e, portanto, com deficiência de tiamina, e caracteriza-se por manifestações neurológicas e cardíacas. A lesão do sistema nervoso periférico manifesta-se como dor nos membros, fraqueza muscular e distorção da sensibilidade cutânea. Além disso, podem ocorrer cardiomegalia e débito cardíaco inadequado.

Quais processos bioquímicos poderiam ser comprometidos pela deficiência de tiamina? A tiamina é o precursor do cofator tiamina pirofosfato. *Esse cofator é o grupo prostético de três enzimas importantes: piruvato desidrogenase,* α*-cetoglutarato desidrogenase e transcetolase*. A transcetolase atua na via de pentose fosfato, que será descrita no Capítulo 20. *A característica comum das reações enzimáticas que utilizam TPP é a transferência de uma unidade aldeído ativada*. No beribéri, os níveis sanguíneos de piruvato e α-cetoglutarato são mais elevados do que o normal. O aumento dos níveis sanguíneos de piruvato é especialmente acentuado depois da ingestão de glicose. Um achado correlato é que as atividades *in vivo* dos complexos piruvato desidrogenase e α-cetoglutarato desidrogenase estão anormalmente baixas. A baixa atividade da transcetolase nas hemácias de indivíduos com beribéri é um indicador diagnóstico confiável e de fácil determinação da doença.

Por que a deficiência de TPP resulta basicamente em transtornos neurológicos? O sistema nervoso tem como única fonte de energia a glicose. O produto da glicólise, o piruvato, consegue entrar no ciclo do ácido cítrico apenas por meio do complexo piruvato desidrogenase. Com essa enzima desativada, o sistema nervoso não tem fontes de energia. Em contrapartida, a maioria dos outros tecidos consegue usar gordura como fonte de energia para o ciclo do ácido cítrico.

Manifestações semelhantes aos do beribéri aparecem em organismos expostos a mercúrio ou arsenito (AsO_3^{3-}). Tanto o mercúrio como o arsenito apresentam afinidade elevada pelas sulfidrilas adjacentes, como as encontradas nos grupos di-hidrolipoil reduzidos do componente E_3 do complexo piruvato desidrogenase (Figura 17.22). A ligação do mercúrio ou do arsenito aos grupos dihidrolipoil inibe o complexo e resulta em patologias do sistema nervoso central. A expressão "louco como um chapeleiro" refere-se ao comportamento peculiar dos chapeleiros envenenados porque usavam nitrato de mercúrio para amaciar e moldar as peles de animais. Essa forma de mercúrio é absorvida através da pele. Manifestações clínicas semelhantes acometeram os fotógrafos

mais antigos que utilizavam mercúrio vaporizado para criar daguerreótipos.

O tratamento desses envenenamentos consiste na administração de reagentes sulfidrílicos com grupos sulfidrila adjacentes para competir com os resíduos di-hidrolipoil pela ligação ao íon metálico. O complexo reagentemetal é, então, excretado por via renal. Na verdade, o 2,3-dimercaptopropanol (Figura 17.22) foi criado após a Primeira Guerra Mundial como antídoto para lewisite, uma arma química à base de arsênico. Esse composto foi inicialmente chamado de BAL (do inglês *British antilewisite)*.

Beribéri

Doença consequente à deficiência vitamínica descrita em 1630 por Jacob Bonitus, um médico holandês que trabalhava em Java:

"Uma moléstia extremamente aflitiva, que acomete homens, é denominada pelos habitantes beribéri (que significa carneiro). Eu acredito que as pessoas acometidas por essa enfermidade caminham de modo semelhante aos carneiros, ou seja, balançando os joelhos e com as pernas elevadas. É um tipo de paralisia, ou melhor, tremor, pois compromete o movimento e a sensibilidade das mãos e dos pés, podendo ocorrer também em todo o corpo."

[The Granger Collection.]

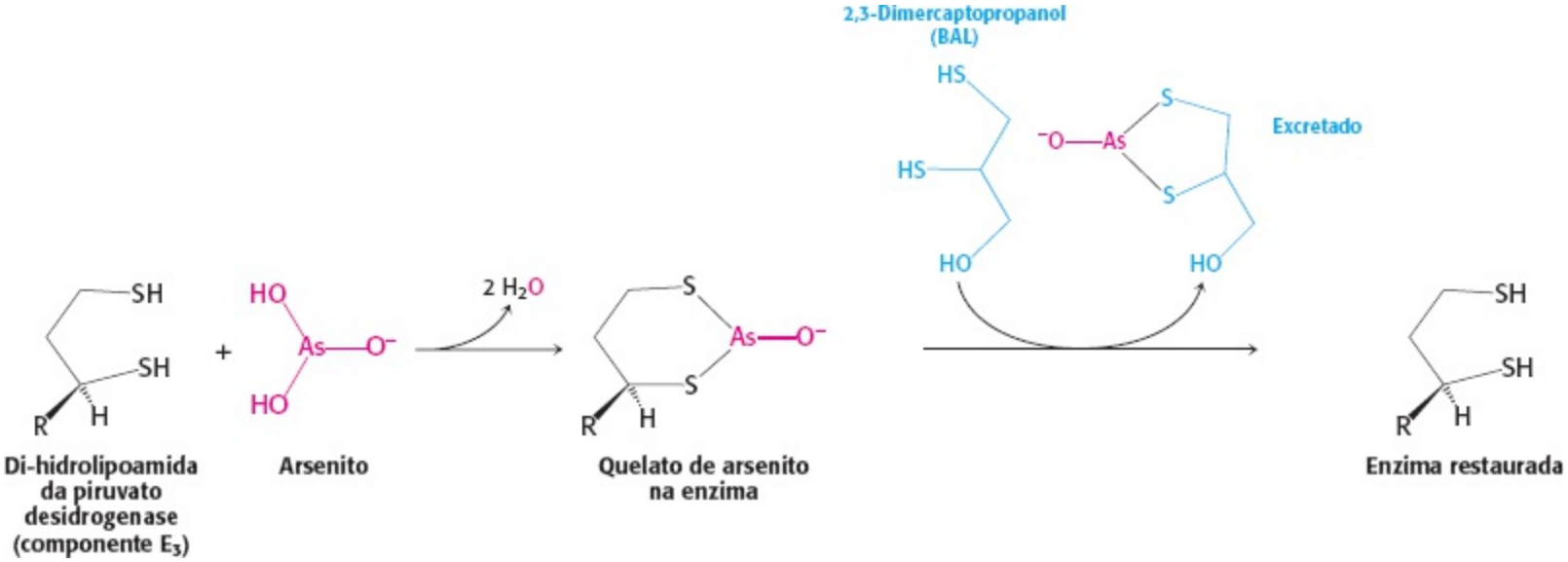


Figura 17.22 Envenenamento por arsenito. O arsenito inibe o complexo piruvato desidrogenase ao inativar o componente di-hidrolipoamida da transacetilase. Alguns reagentes sulfidrila, como 2,3-dimercaptopropanol, alivia a inibição ao formar um complexo com arsenito que pode ser excretado.

O manuscrito que propôs a existência do ciclo do ácido cítrico foi submetido para publicação à revista *Nature*, mas foi rejeitado em junho de 1937. Nesse mesmo ano foi publicado na *Enzymologia*. Dr. Krebs exibiu, com orgulho, a carta de rejeição durante toda a sua carreira como uma forma de encorajamento para os jovens cientistas.

"O editor da NATURE apresenta seus cumprimentos ao Dr. H. A. Krebs e lamenta que já tenha material suficiente para publicar na seção de cartas dos leitores nas próximas 7 ou 8 semanas. Não é desejável aceitar mais material no presente momento tendo em vista a inevitável demora na publicação.

Se o Dr. Krebs não se importar com essa demora, o editor conservará o material até todos os trabalhos aceitos serem apresentados ao público na esperança de talvez usá-lo.

O editor devolverá seu trabalho caso o Dr. Krebs prefira uma publicação mais rápida, preferindo submetê-lo a outro periódico."

O ciclo do ácido cítrico pode ter evoluído a partir de vias preexistentes

Como surgiu o ciclo do ácido cítrico? Embora ainda não haja respostas definitivas, é possível haver especulações bem fundamentadas. Talvez possamos começar a compreender como a evolução pode atuar ao nível das vias bioquímicas.

O ciclo do ácido cítrico foi criado, mais provavelmente, a partir de vias preexistentes. Como já foi mencionado, muitos dos intermediários formados no ciclo do ácido cítrico são usados nas vias metabólicas dos aminoácidos e das porfirinas. Provavelmente, compostos como piruvato, α-cetoglutarato e oxaloacetato já existiam em uma fase inicial da evolução para fins de biossíntese. A descarboxilação oxidativa desses α-cetoácidos é muito favorável termodinamicamente e pode ser usada para impulsionar a síntese de NADH e derivados do acil-CoA. Essas reações quase certamente formaram o cerne dos processos que precederam o ciclo do ácido cítrico na escala evolutiva. É interessante lembrar que o α-cetoglutarato pode ser convertido diretamente em oxaloacetato por meio de transaminação dos respectivos aminoácidos pela aspartato aminotransferase (AST), outra enzima crucial da biossíntese. Assim sendo, ciclos com números menores de intermediários para vários propósitos bioquímicos poderiam ter existido antes de a atual forma ter evoluído.

17.5 O ciclo do glioxilato possibilita que plantas e bactérias cresçam em acetato

Acetil-CoA que entra no ciclo do ácido cítrico tem apenas um destino: oxidação a CO_2 e H_2O. A maioria dos organismos não consegue converter acetil-CoA em glicose porque o oxaloacetato, um precursor crucial da glicose, é formado no ciclo do ácido cítrico, mas, como ocorrem duas descarboxilações antes de sua regeneração, não é possível a conversão *efetiva* de acetil-CoA em glicose.

Nas plantas e em alguns microrganismos, existe uma via metabólica que possibilita a conversão de acetil-CoA gerada a partir das reservas de gordura em glicose. Essa sequência da reação, denominada ciclo do glioxilato, é semelhante ao ciclo do ácido cítrico, mas contorna (*bypass*) as duas etapas de descarboxilação do ciclo. Outra diferença importante é que duas moléculas de acetil-CoA entram por vez no ciclo do glioxilato, em comparação com uma no ciclo do ácido cítrico.

O ciclo do glioxilato (Figura 17.23), como o ciclo do ácido cítrico, começa com a condensação de acetil-CoA e oxaloacetato para formar citrato, que depois é isomerizado a isocitrato. Em vez de ser descarboxilado, como ocorre no ciclo do ácido cítrico, o isocitrato é clivado pela enzima *isocitrato liase* em succinato e glioxilato. As etapas seguintes regeneram oxaloacetato a partir do glioxilato. Primeiro, a acetil-CoA condensa-se com glioxilato para formar malato em uma reação catalisada pela enzima *malato sintase* e, depois, o malato é oxidado a oxaloacetato, como no ciclo do ácido

cítrico. A soma dessas reações é

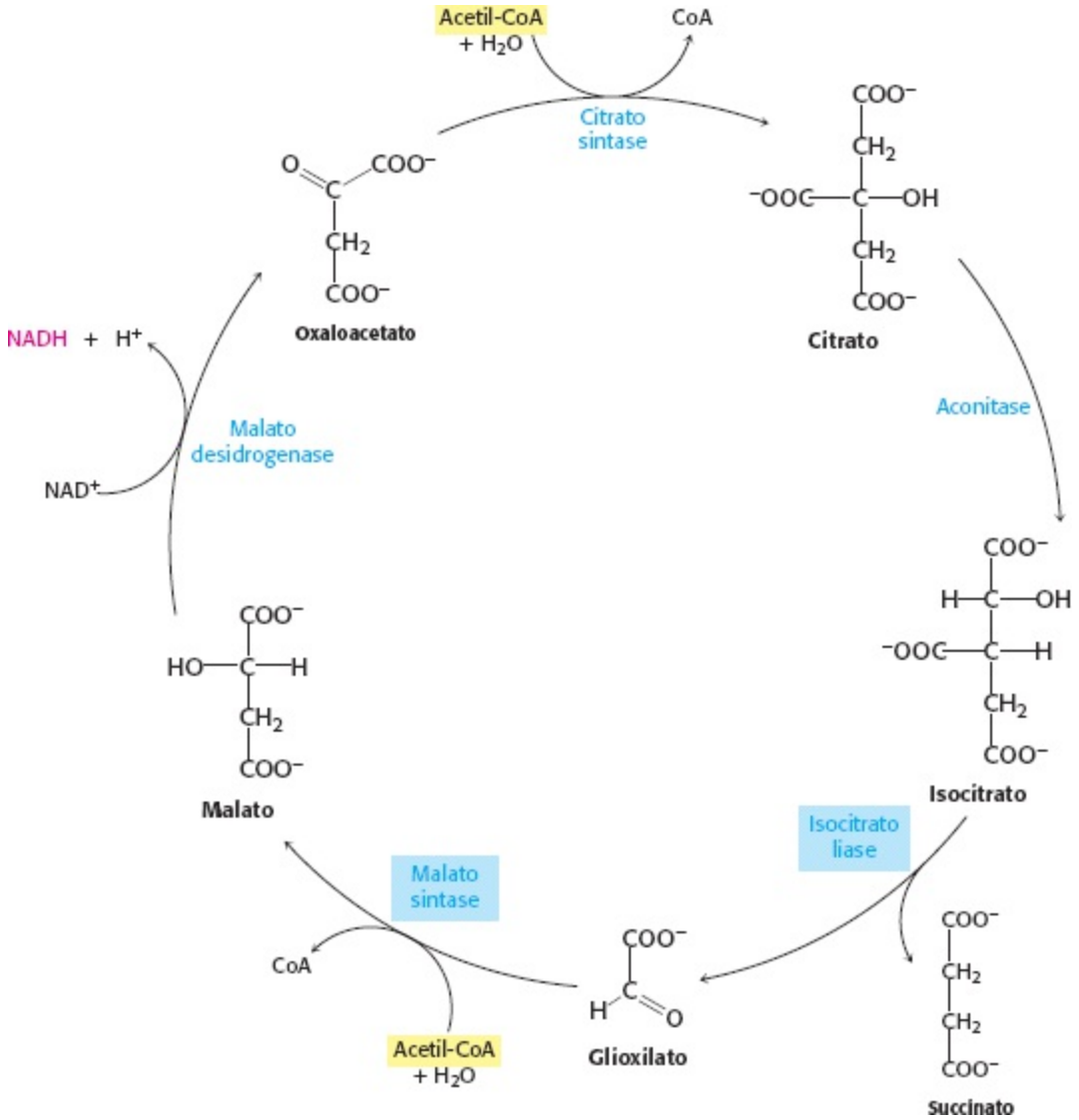


Figura 17.23 Via do glioxilato. O ciclo do glioxilato possibilita o crescimento de plantas e de alguns microrganismos em acetato porque contorna as etapas de descarboxilação do ciclo do ácido cítrico. As reações desse ciclo são as mesmas do ciclo do ácido cítrico, com exceção daquelas catalisadas por isocitrato liase e malato sintase, que estão assinaladas em azul.

$$2 \text{ acetil-CoA} + NAD^+ + 2\ H_2O \rightarrow \text{succinato} + 2\ \text{CoASH} + NADH + 2\ H^+$$

Nas plantas essas reações ocorrem em organelas denominadas *glioxissomas*. Esse ciclo é especialmente significativo em sementes ricas em óleo, como as de girassol, pepinos e mamona. Succinato, liberado no meio do ciclo, pode ser convertido em carboidratos por meio de uma combinação do ciclo do ácido cítrico e gliconeogênese. Os carboidratos estimulam o crescimento das sementes até que a célula consiga iniciar a fotossíntese. Assim, organismos com o ciclo do glioxilato ganha versatilidade metabólica porque conseguem utilizar acetil-CoA como precursor de glicose e de outras biomoléculas.

Resumo

O ciclo do ácido cítrico é a via final comum da oxidação das moléculas energéticas. Também é

uma fonte de elementos estruturais para biossíntese.

17.1 Piruvato desidrogenase conecta a glicólise ao ciclo do ácido cítrico

A maioria das moléculas energéticas entra no ciclo do ácido cítrico na forma de acetil-CoA. O elo entre a glicólise e o ciclo do ácido cítrico é a descarboxilação oxidativa do piruvato para formar acetil-CoA. Nos eucariotos essa reação e as reações do ciclo do ácido cítrico ocorrem nas mitocôndrias, ao contrário da glicólise, que ocorre no citoplasma.

17.2 O ciclo do ácido cítrico oxida duas unidades de carbono

O ciclo começa com a condensação de oxaloacetato (C_4) e acetil-CoA (C_2) para produzir citrato (C_6), que é isomerizado a isocitrato (C_6). A descarboxilação oxidativa desse intermediário produz α-cetoglutarato (C_5). A segunda molécula de dióxido de carbono surge na reação seguinte, na qual α-cetoglutarato sofre descarboxilação oxidativa e se torna succinil-CoA (C_4). A ligação tioéster da succinil-CoA é clivada por ortofosfato, com produção de succinato e ATP. O succinato é oxidado a fumarato (C_4), que é hidratado para formar malato (C_4). Por fim, malato é oxidado para regenerar oxaloacetato (C_4). Assim, dois átomos de carbono oriundos de acetil-CoA entram no ciclo e dois átomos de carbono deixam o ciclo na forma de CO_2 nas sucessivas descarboxilações catalisadas pelas enzimas isocitrato desidrogenase e α-cetoglutarato desidrogenase. Nas quatro reações de oxirredução do ciclo, três pares de elétrons são transferidos para NAD^+ e um par para FAD. Esses carreadores de elétrons reduzidos são, posteriormente, oxidados pela cadeia de transporte de elétrons com a geração de aproximadamente 9 moléculas de ATP. Além disso, uma molécula de um composto com elevado potencial de transferência de fosforila é diretamente formada no ciclo do ácido cítrico. Portanto, um total de 10 moléculas de compostos com elevado potencial de transferência de fosforila são gerados para cada fragmento com dois carbonos que é completamente oxidado em H_2O e CO_2.

17.3 A entrada no ciclo do ácido cítrico e o metabolismo por meio dele são controlados

O ciclo do ácido cítrico só funciona em condições aeróbicas porque precisa de NAD^+ e FAD. A formação irreversível de acetil-CoA a partir de piruvato é um importante ponto de regulação da entrada do piruvato derivado de glicose no ciclo do ácido cítrico. A atividade do complexo piruvato desidrogenase é rigorosamente controlada por fosforilação reversível. Os aceptores de elétrons são regenerados quando NADH e $FADH_2$ transferem seus elétrons para O_2 por meio da cadeia de transporte de elétrons, com a concomitante produção de ATP. Consequentemente, a velocidade do ciclo do ácido cítrico depende da necessidade de ATP. Nos eucariotos, a regulação de duas enzimas no ciclo também é importante para o controle. Uma carga energética alta diminui as atividades das enzimas isocitrato desidrogenase e α-cetoglutarato desidrogenase. Esses mecanismos se complementam e reduzem a velocidade de formação de acetil-CoA quando a carga energética da célula é elevada e quando há abundância de intermediários da biossíntese.

17.4 O ciclo do ácido cítrico é uma fonte de precursores da biossíntese

Quando a célula dispõe de energia adequada, o ciclo do ácido cítrico também é uma fonte de

elementos estruturais para uma gama de importantes biomoléculas, tais como bases nucleotídicas, proteínas e grupamentos heme. Isso implica a depleção do ciclo de intermediários. Quando o ciclo precisa metabolizar novamente fontes energéticas, reações anapleróticas repõem os intermediários do ciclo.

17.5 O ciclo do glioxilato possibilita que plantas e bactérias cresçam em acetato

O ciclo do glioxilato incrementa a versatilidade metabólica de muitas plantas e bactérias. Esse ciclo, que emprega algumas das reações do ciclo do ácido cítrico, possibilita que esses organismos subsistam em acetato porque contorna (*bypass*) as duas etapas de descarboxilação do ciclo do ácido cítrico.

Palavras-chave

α-cetoglutarato desidrogenase (p. 511)
acetil-CoA (p. 501)
beribéri (p. 521)
ciclo do ácido cítrico (ácido tricarboxílico, TCA; ciclo de Krebs) (p. 501)
ciclo do glioxilato (p. 522)
citrato sintase (p. 508)
complexo piruvato desidrogenase (p. 503)
flavoproteína (p. 506)
fosforilação oxidativa (p. 502)
glioxissoma (p. 523)
isocitrato desidrogenase (p. 510)
isocitrato liase (p. 523)
malato sintase (p. 523)
metabolon (p. 516)
proteína ferro-enxofre (ferro não heme) (p. 510)
reação anaplerótica (p. 520)

Questões

1. *Nomes são importantes*. Quais são as cinco enzimas (incluindo as enzimas reguladoras) que constituem o complexo piruvato desidrogenase? Quais são as reações que elas catalisam?

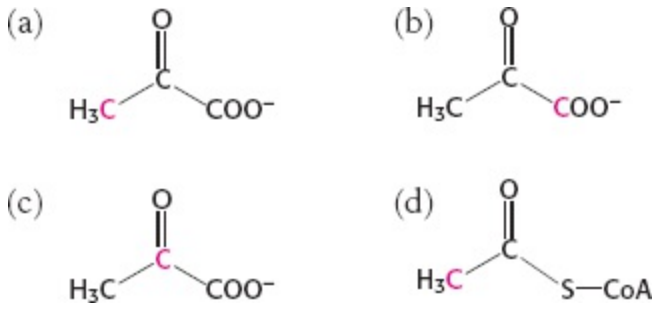
2. *Coenzimas*. Quais são as coenzimas exigidas pelo complexo piruvato desidrogenase? Quais são suas funções?

3. *Mais coenzimas*. Faça a diferenciação entre as coenzimas catalíticas e as estoiquiométricas no complexo piruvato desidrogenase.

4. *A organização*. Cite algumas das vantagens de organizar as enzimas que catalisam a formação de acetil-CoA a partir do piruvato em um grande complexo.

5. *Fluxo de átomos de carbono*. Qual é o destino do marcador radioativo quando cada um dos seguintes compostos é adicionado a um extrato celular contendo as enzimas e os cofatores da via glicolítica, do ciclo do ácido cítrico e do complexo piruvato desidrogenase? (O marcador ^{14}C é

assinalado em vermelho.)



(e) Glicose 6-fosfato marcada em C-1.

6. $C_2 + C_2 \rightarrow C_4$

(a) Quais são as enzimas necessárias para obter *síntese efetiva* de oxaloacetato a partir de acetil-CoA?

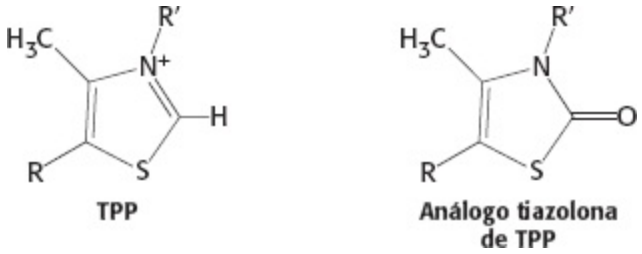
(b) Escreva uma equação balanceada para a síntese efetiva.

(c) As células de mamíferos contêm as enzimas necessárias?

7. *Força impulsora*. Qual é $\Delta G^{o\prime}$ para a oxidação completa da unidade acetila da acetil-CoA pelo ciclo do ácido cítrico?

8. *Ação catalítica*. O próprio ciclo do ácido cítrico, que é constituído por etapas catalisadas por enzimas, pode ser considerado essencialmente como uma enzima supramolecular. Explique.

9. *Um inibidor potente*. Tiamina tiazolona pirofosfato ligase a piruvato desidrogenase cerca de 20.000 vezes mais intensamente do que a tiamina pirofosfato (TPP) e inibe a enzima de forma competitiva. Por quê?



10. *Acidose láctica*. Pacientes em choque frequentemente apresentam acidose láctica consequente a deficiência de O_2. Por que a falta de O_2 resulta em acúmulo de ácido láctico? Um tratamento para o choque consiste em administrar dicloroacetato, que inibe a quinase associada ao complexo piruvato desidrogenase. Qual é a base bioquímica para essa abordagem terapêutica?

11. *Rico em energia*. Quais são os tioésteres na reação catalisada pelo complexo PDH?

12. *Destinos alternativos*. Compare a regulação do complexo piruvato desidrogenase nos músculos e no fígado.

13. *Mutações*. (a) Preveja o efeito de uma mutação que aumente a atividade da quinase associada ao complexo piruvato desidrogenase. (b) Preveja o efeito de uma mutação que reduza a atividade da fosfatase associada ao complexo PDH.

14. *Paredes descascadas, papel de parede verde*. Clare Boothe Luce, embaixadora norte-americana na Itália na década de 1950 (além de ser congressista, dramaturga, editora da revista *Vanity Fair* e esposa de Henry Luce, fundador dos periódicos *Time* e *Sports Illustrated*) adoeceu enquanto morava na embaixada em Roma. A tinta no teto da sala de jantar, à base de arsênico, estava descascando; o papel de parede do quarto da embaixadora estava esverdeado devido ao arsenito cúprico (verde cúprico) existente no pigmento. Sugira uma possível causa para a doença da embaixadora Luce.

15. *Uma emboscada, talvez?* O ciclo do ácido cítrico faz parte da respiração aeróbica, contudo, O_2 não é necessário para o ciclo. Explique esse paradoxo.

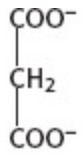
16. *Reações acopladas*. A oxidação de malato por NAD^+ para formar oxaloacetato é uma reação extremamente endergônica em condições padrões [$\Delta G^{o\prime}$ = 29 kJ mol^{-1} (7 kcal mol^{-1})]. A reação prossegue sem intercorrências em condições fisiológicas.

(a) Por quê?

(b) Pressupondo uma razão $[NAD^+]/[NADH]$ de 8 e um pH de 7, qual é a menor razão [malato]/[oxaloacetato] na qual oxaloacetato pode ser formado a partir de malato?

17. *Síntese de* α*-cetoglutarato*. É possível, com o uso das reações e enzimas consideradas neste capítulo, converter piruvato em α-cetoglutarato sem depletar os componentes do ciclo do ácido cítrico. Escreva uma reação balanceada para essa conversão, mostrando os cofatores e identificando as enzimas necessárias.

18. *Inibidor à vista*. Malonato é um inibidor competitivo da succinato desidrogenase. Como as concentrações de intermediários do ciclo do ácido cítrico se modificam imediatamente após o acréscimo de malonato? Por que o malonato não é um substrato da succinato desidrogenase?



Malonato

19. *Nenhum sinal, nenhuma atividade*. Por que acetil-CoA é um ativador especialmente apropriado da piruvato carboxilase?

20. *Diferenças*. Como veremos no próximo capítulo, quando NADH reage com oxigênio, são gerados 2,5 ATP. Quando $FADH_2$ reduz oxigênio, apenas 1,5 ATP é gerado. Por que succinato desidrogenase produz $FADH_2$, em vez de NADH, quando succinato é reduzido a fumarato?

21. *De volta à química orgânica*. Antes que a oxidação possa ocorrer no ciclo do ácido cítrico, citrato tem de ser isomerizado a isocitrato. Explique o motivo.

22. *Equivalências*. Explique por que uma molécula de GTP ou de outro nucleosídio trifosfato é energeticamente equivalente a uma molécula de ATP no metabolismo.

23. *É preciso escolher um*. A síntese de citrato a partir de acetil-CoA e oxaloacetato é uma reação de biossíntese. Qual é a fonte de energia que impulsiona a formação de citrato?

Questões | Integração de capítulos

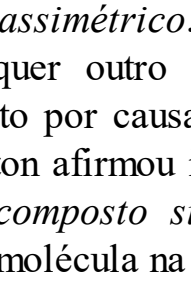
24. *Gordura se torna glicose*? De modo geral, as gorduras são metabolizadas em acetil-CoA e, depois, processadas pelo ciclo do ácido cítrico. No Capítulo 16 vimos que a glicose pode ser sintetizada a partir de oxaloacetato, um intermediário do ciclo do ácido cítrico. Assim sendo, por que, após um período prolongado de exercícios físicos que depleta as reservas de carboidratos, é necessário repô-las por meio de consumo de carboidratos? Por que não há simplesmente conversão de gordura em carboidratos?

25. *Fontes energéticas alternativas*. Como será mostrado no Capítulo 22, a degradação de ácidos graxos geram uma grande quantidade de acetil-CoA. Qual será o efeito da degradação de ácidos graxos na atividade do complexo piruvato desidrogenase? E na glicólise?

Questões sobre Mecanismo

26. *Um tema e suas variações*. Proponha um mecanismo de reação para a condensação de acetil-CoA e glioxilato no ciclo do glioxilato de plantas e bactérias.

27. *Problemas de simetria*. Em experiências realizadas em 1941 para investigar o ciclo do ácido cítrico, oxaloacetato marcado com ^{14}C no átomo carbono da carboxila mais distante do grupo ceto foi introduzido em uma preparação ativa de mitocôndrias.



Oxaloacetato

A análise do **α**-cetoglutarato formado mostrou que nenhum marcador radioativo foi perdido. A descarboxilação do **α**-cetoglutarato produziu succinato sem radioatividade. Toda a marcação estava no CO_2 liberado. Por que os pesquisadores mais antigos do ciclo do ácido cítrico se surpreenderam com o fato de *toda* a marcação se encontrar no CO_2?

28. *Moléculas simétricas reagem de modo assimétrico*. A interpretação dos experimentos descritos na Questão 27 foi que citrato (ou qualquer outro composto simétrico) não poderia ser um intermediário na formação de α-cetoglutarato por causa do destino assimétrico do marcador. Essa opinião foi acatada até que Alexander Ogston afirmou incisivamente em 1948 que "*é possível que uma enzima assimétrica que ataca um composto simétrico consiga diferenciar seus grupos idênticos*". Para simplificar, considere uma molécula na qual dois átomos de hidrogênio, um grupo X e um grupo Y diferente estão ligados a um átomo de carbono tetraédrico como um modelo para citrato. Explique como uma molécula simétrica consegue reagir com uma enzima de maneira assimétrica.

Questão | Interpretação de dados

29. *Uma via muito longa*. Como será esclarecido no Capítulo 18, a atividade do ciclo do ácido cítrico pode ser monitorada pela determinação do O_2 consumido. Quanto maior o consumo de O_2,

mais rápido é o ciclo do ácido cítrico. Hans Krebs utilizou esse ensaio para investigar o ciclo em 1937. Ele empregou músculo peitoral de pombo picado como seu sistema experimental, pois este é rico em mitocôndrias. Em um conjunto de experimentos, Krebs determinou o consumo de O_2 na presença de apenas carboidratos e o consumo de O_2 na presença de carboidratos e citrato. Os resultados são mostrados na tabela a seguir.

Efeito do citrato no consumo de oxigênio pelo músculo peitoral de pombo picado.

	Micromoles de oxigênio consumido	
Intervalo de tempo (minutos)	Carboidratos apenas	Carboidratos + 3 µmol de citrato
10	26	28
60	43	62
90	46	77
150	49	85

(a) Quanto O_2 seria absorvido se o citrato adicionado fosse completamente oxidado a H_2O e CO_2?

(b) Com base na sua resposta à parte *a*, o que os resultados apresentados na tabela sugerem?

30. *Envenenamento por arsenito*. O efeito do arsenito no sistema experimental da Questão 29 foi, então, examinado. Dados experimentais (que não são apresentados aqui) mostraram que a quantidade de citrato encontrado não modificava a evolução da experiência se não houvesse arsenito. Todavia, se fosse acrescido arsenito ao sistema, seriam obtidos resultados diferentes, como se vê na tabela a seguir.

Desaparecimento do ácido cítrico do músculo peitoral de pombo na presença de arsenito.

Micromoles de citrato adicionados	Micromoles de citrato encontrados após 40 min	Micromoles de citrato utilizados
22	00,6	21
44	20,0	24
90	56,0	34

(a) Qual é o efeito do arsenito no desaparecimento do citrato?

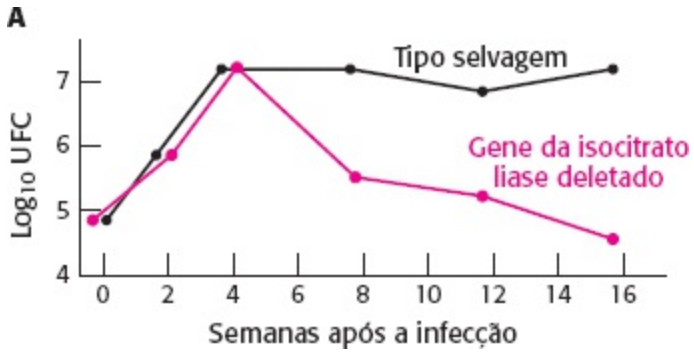
(b) Como a ação do arsenito é modificada pelo acréscimo de mais citrato?

(c) O que esses dados sugerem a respeito do local de ação do arsenito?

31. *Isocitrato liase e tuberculose*. A bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, a causa da tuberculose (TB), consegue invadir os pulmões e persistir em um estado latente durante muitos anos. Durante esse período as bactérias ficam albergadas em granulomas – cicatrizes nodulares contendo bactérias e restos celulares do hospedeiro no centro e células imunes na periferia. Os granulomas são ambientes

ricos em lipídios, e pobres em oxigênio. Ainda não foi totalmente esclarecido como essas bactérias conseguem sobreviver nos granulomas. Os resultados de pesquisas recentes sugerem que o ciclo do glioxilato é responsável pela persistência dessas bactérias. Os seguintes dados quantificam as bactérias [apresentadas como unidades formadoras de colônias (UFC)] nos pulmões de camundongos nas semanas seguintes a uma infecção.

No gráfico A, os círculos pretos representam os resultados para bactérias selvagens e os círculos vermelhos resultados para bactérias cujo gene para a isocitrato liase foi deletado.



(a) Qual é o efeito da ausência da isocitrato liase?

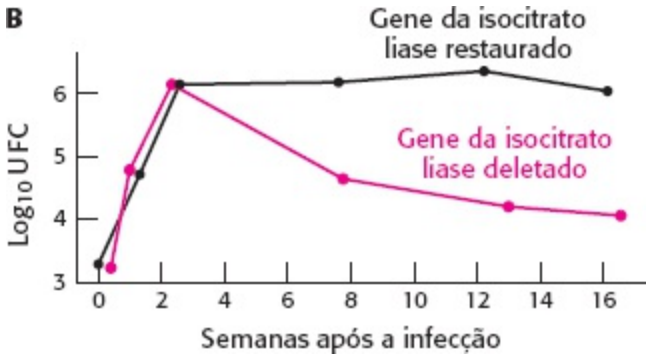
As técnicas descritas no Capítulo 5 foram empregadas na reinserção do gene codificador da isocitrato liase em bactérias das quais fora anteriormente deletado.

No gráfico B os círculos pretos representam as bactérias nas quais o gene foi reinserido e os círculos vermelhos representam bactérias nas quais o gene codificador da isocitrato liase foi deletado.

(b) Esses resultados apoiam os resultados obtidos na parte a?

(c) Qual é o propósito do experimento na parte b?

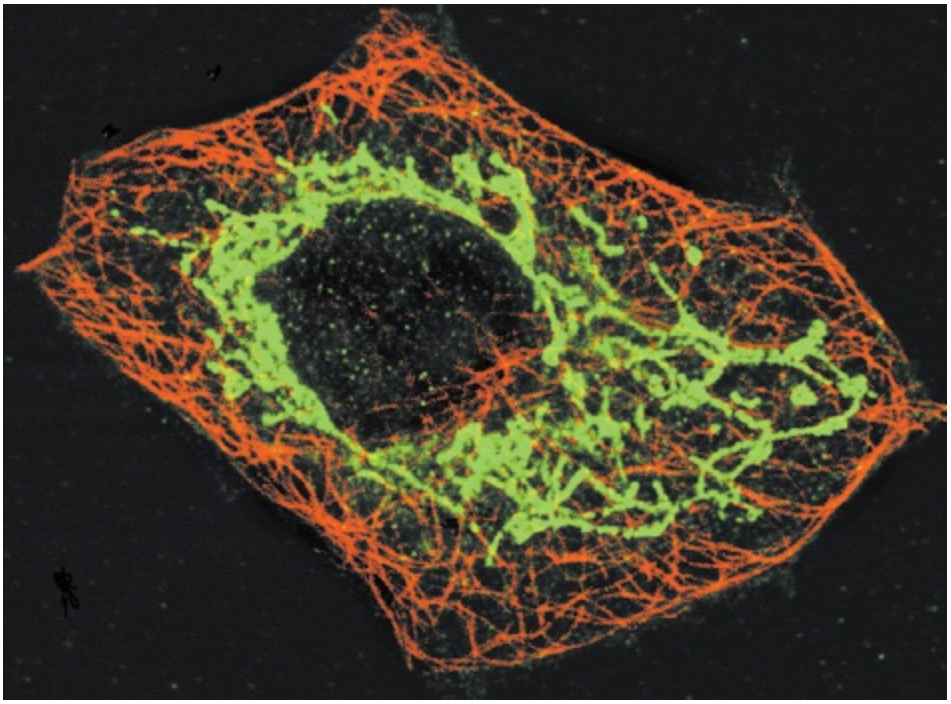
(d) Por que essas bactérias morrem quando não há o ciclo do glioxilato?

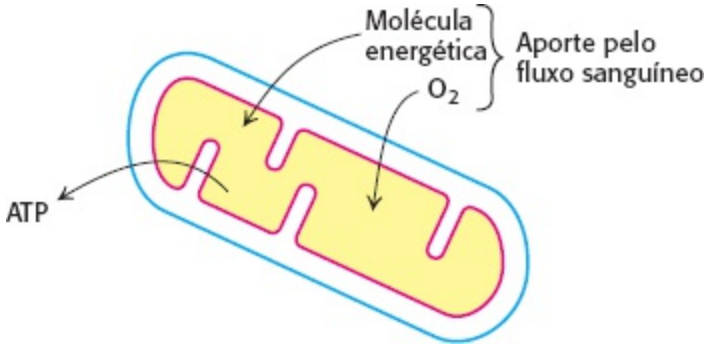


[Dados de McKinney *et al.*, *Nature* 406(2000):735-738.]

Fosforilação Oxidativa

18





As mitocôndrias, coradas em verde, formam uma rede no interior de um fibroblasto (à esquerda). Elas oxidam fontes de carbono para formar energia celular na forma de ATP. [Fotografia à esquerda, cortesia de Michael P. Yaffee, Department of Biology, University of California, San Diego.]

SUMÁRIO

18.1 A fosforilação oxidativa nos eucariotos ocorre nas mitocôndrias

18.2 A fosforilação oxidativa depende da transferência de elétrons

18.3 A cadeia respiratória é constituída por quatro complexos: três bombas de prótons e uma ligação física com o ciclo do ácido cítrico

18.4 Um gradiente de prótons impulsiona a síntese de ATP

18.5 Muitos circuitos ou lançadeiras (*shuttles*) possibilitam o movimento através das membranas mitocondriais

18.6 A regulação da respiração celular é dirigida primariamente pela necessidade de ATP

É surpreendente a quantidade de ATP que os seres humanos precisam para viver. Um homem sedentário de 70 kg precisa de aproximadamente 8.400 kJ (2.000 kcal) para 1 dia de atividade. São necessários 83 kg de ATP para atender a essa imensa demanda de energia. Todavia, os seres humanos possuem apenas cerca de 250 g de ATP a qualquer momento. A diferença entre o ATP de que dispomos e o que necessitamos é compensada pela reciclagem do ADP em ATP. Cada molécula de ATP é reciclada aproximadamente 300 vezes/dia. Essa reciclagem ocorre primariamente por meio de fosforilação oxidativa.

Nós começaremos nosso estudo da fosforilação oxidativa com a análise das reações de oxirredução que possibilitam o fluxo de elétrons do NADH e do $FADH_2$ para o oxigênio. O fluxo de elétrons ocorre em quatro grandes complexos proteicos que estão engastados na membrana mitocondrial interna e juntos são denominados *cadeia respiratória* ou *cadeia de transporte de elétrons*.

$$NADH + \tfrac{1}{2}O_2 + H^+ \rightarrow H_2O + NAD^+$$

$$\Delta G^{o\prime} = -220{,}1 \text{ kJ mol}^{-1} \ (-52{,}6 \text{ kcal mol}^{-1})$$

A reação total é exergônica. É importante mencionar que três dos complexos da cadeia de transporte de elétrons utilizam a energia liberada pelo fluxo de elétrons para bombear prótons da matriz mitocondrial para o citoplasma. Em suma, a energia é transformada. A consequente distribuição desigual dos prótons gera um gradiente de pH e um potencial elétrico transmembrana que gera a *força próton-motriz*. ATP é sintetizado quando os prótons fluem de volta para a matriz mitocondrial por meio de um complexo enzimático.

$$ADP + P_i + H^+ \rightarrow ATP + H^2O$$

$$\Delta G^{o\prime} = +30{,}5 \text{ kJ mol}^{-1} \ (+7{,}3 \text{ kcal mol}^{-1})$$

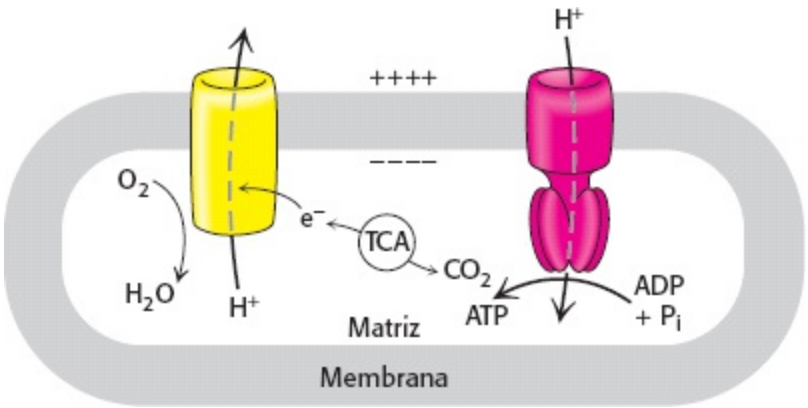


Figura 18.1 Resumo da fosforilação oxidativa. A oxidação e a síntese de ATP são acopladas pelos fluxos de prótons transmembrana. Os elétrons fluem de NADH e $FADH_2$ através de quatro complexos proteicos para reduzir oxigênio a água. Três dos complexos bombeiam prótons oriundos da matriz mitocondrial para o exterior das mitocôndrias. Os prótons retornam à matriz por meio do fluxo através de outro complexo proteico, a ATP sintase, que gera força para a síntese de ATP.

Portanto, *a oxidação das fontes energéticas e a fosforilação do ADP são acopladas por um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna* (Figura 18.1).

Coletivamente, a geração de elétrons com alto potencial de transferência pelo ciclo do ácido

cítrico, seu fluxo através da cadeia respiratória e a síntese associada de ATP é denominada *respiração* ou *respiração celular*.

Respiração

Um processo de geração de ATP no qual um composto inorgânico (como oxigênio molecular) atua como o último aceptor de elétrons. O doador de elétrons pode ser um composto orgânico ou um composto inorgânico.

18.1 A fosforilação oxidativa nos eucariotos ocorre nas mitocôndrias

É preciso recordar que o propósito bioquímico do ciclo do ácido cítrico, que ocorre nas mitocôndrias, é gerar elétrons de alta energia. Portanto, é apropriado que a fosforilação oxidativa, que converterá a energia desses elétrons em ATP, também ocorra nas mitocôndrias. As mitocôndrias são organelas ovaladas, tipicamente têm cerca de 2 μm de comprimento e 0,5 μm de diâmetro (aproximadamente o tamanho de uma bactéria. Eugene Kennedy e Albert Lehninger descobriram, há mais de 50 anos, que *as mitocôndrias contêm o conjunto respiratório, as enzimas do ciclo do ácido cítrico e as enzimas da oxidação de ácidos graxos.*

As mitocôndrias têm membrana dupla

Os estudos com microscopia eletrônica, realizados por George Palade e Fritjof Sjöstrand, revelaram que as mitocôndrias apresentam dois sistemas de membranas: uma *membrana externa* e uma *membrana interna*, extensa e extremamente dobrada. A membrana interna apresenta inúmeras dobraduras internas denominadas *cristas*. Assim, existem dois compartimentos no interior das mitocôndrias: (1) o *espaço intermembrana*, entre as membranas externa e interna, e (2) a *matriz*, que é delimitada pela membrana interna (Figura 18.2). A matriz mitocondrial é o local onde ocorrem a maioria das reações do ciclo do ácido cítrico e a oxidação dos ácidos graxos. Em contrapartida, a fosforilação oxidativa ocorre na membrana mitocondrial interna. O aumento da área de superfície da membrana mitocondrial interna (proporcionado pelas cristas) cria mais locais para a fosforilação oxidativa do que haveria se a membrana fosse simples e sem dobraduras. Os seres humanos têm aproximadamente 14.000 m^2 de membrana mitocondrial interna, que é o equivalente a cerca de três campos de futebol americano.

A membrana externa é muito permeável a maioria das moléculas pequenas e íons porque contém muitas cópias de porina mitocondrial, uma proteína formadora de poros com 30 a 35 kDa que também é conhecida como VDAC (do inglês *voltage-dependent anion channel*, ou seja canal aniônico dependente de voltagem). A VDAC, a proteína mais prevalente na membrana mitocondrial externa, participa no fluxo regulado de metabólitos – habitualmente espécies aniônicas como fosfato, cloreto, ânions orgânicos e os nucleotídios adenina – através da membrana externa. Por outro lado, a membrana interna é impermeável a quase todos os íons e moléculas polares. Uma grande família de transportadores carreia metabólitos como ATP, piruvato e citrato através da membrana mitocondrial interna. As duas faces dessa membrana serão designadas como *lado da matriz* e *lado citoplasmático*. O lado citoplasmático recebe essa designação por ser livremente acessível à maioria das moléculas pequenas existentes no citoplasma. Também são denominados lados *N* e *P*,

respectivamente, porque o potencial de membrana é negativo no lado da matriz e positivo no lado citoplasmático.

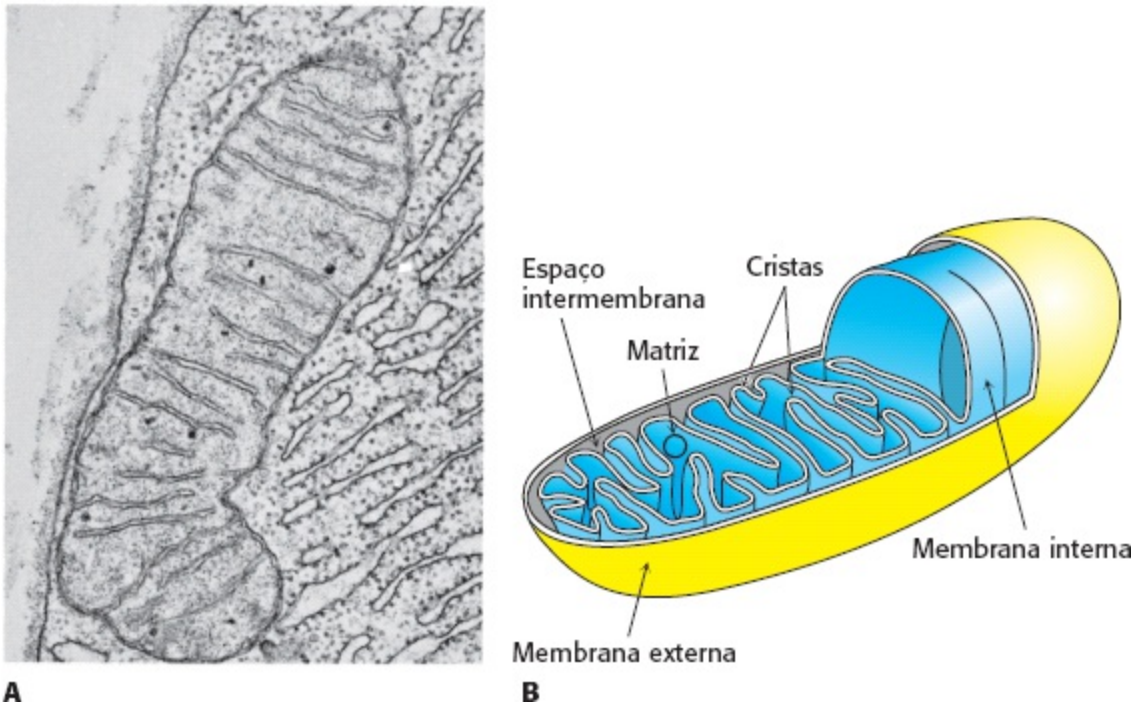


Figura 18.2 Micrografia eletrônica (A) e diagrama (B) de uma mitocôndria. [(A) Cortesia de George Palade. (B) De Wolfe, *Biology of the cell*, 2e, © 1981 Brooks/Cole, Cengage Learning, Inc. Reproduzido, com autorização, de www.cengage.com/permission 3.]

Nos procariotos as bombas de prótons impulsionadas por elétrons e o complexo sintetizador de ATP estão localizados na membrana citoplasmática, a mais interna das duas membranas. A membrana externa das bactérias, como a das mitocôndrias, é permeável a maioria dos pequenos metabólitos graças à existência de porinas.

As mitocôndrias resultam de um evento endossimbiótico

As mitocôndrias são organelas semiautônomas que vivem uma relação endossimbiótica com a célula hospedeira. Essas organelas contêm seu próprio DNA, que codifica várias proteínas diferentes e RNA. Habitualmente, o DNA mitocondrial é descrito como circular; contudo, pesquisas recentes sugerem que o DNA mitocondrial de muitos organismos é linear. O tamanho dos genomas das mitocôndrias varia significativamente de uma espécie para outra. O genoma mitocondrial do protista *Plasmodium falciparum* é constituído por menos de 6.000 pares de bases (pb), enquanto o DNA mitocondrial de algumas plantas terrestres tem mais de 200.000 pb (Figura 18.3). O DNA mitocondrial dos seres humanos consiste em 16.569 pb e codifica 13 proteínas da cadeia respiratória, assim como os pequenos e grandes RNA ribossomiais e tRNA suficientes para traduzir todos os códons. As mitocôndrias, além disso, contêm muitas proteínas codificadas pelo DNA nuclear. As células que contêm mitocôndrias dependem destas para a fosforilação oxidativa e as mitocôndrias, por sua vez, dependem da célula para sua existência. Como surgiu essa relação simbiótica tão próxima?

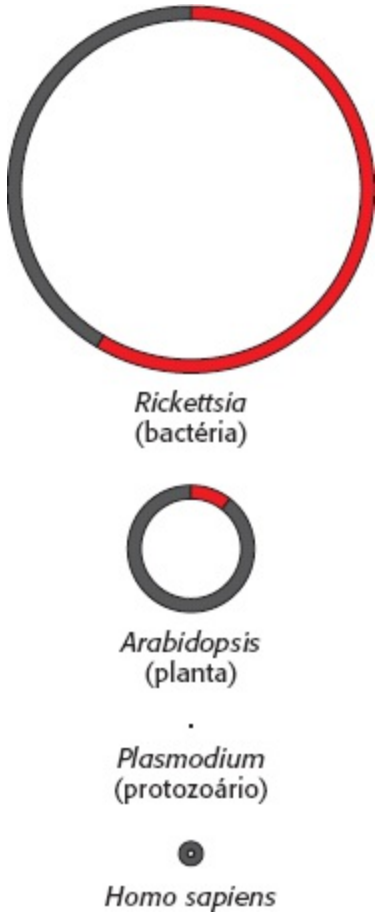


Figura 18.3 Tamanhos dos genomas mitocondriais. O tamanho de três genomas mitocondriais é comparado ao tamanho do genoma de *Rickettsia*, um "parente" do suposto ancestral de todas as mitocôndrias. Quando os genomas têm mais de 60 kpb, a região do DNA que codifica genes com função conhecida é mostrada em vermelho.

Acredita-se que ocorreu um evento endossimbiótico no qual um organismo de vida livre que tinha a capacidade de desempenhar fosforilação oxidativa foi "engolido" por outra célula. A membrana dupla, o DNA circular (com exceções) e a maquinaria específica de tradução e transcrição das mitocôndrias apontam para essa conclusão. Graças ao rápido acúmulo de dados de sequenciamento dos genomas mitocondriais e bacterianos, atualmente é possível especular com alguma autoridade sobre a origem da mitocôndria "original". O genoma bacteriano mais semelhante ao genoma mitocondrial é o da *Rickettsia prowazekii*, a causa do tifo endêmico (transmitido por piolhos). O genoma desse organismo contém de 1 milhão de pares de bases e 834 genes codificadores de proteína. Os dados de sequências de ácidos nucleicos sugerem que todas as mitocôndrias existentes atualmente provêm de um ancestral da *Rickettsia prowazekii* como resultado de um único evento endossimbiótico.

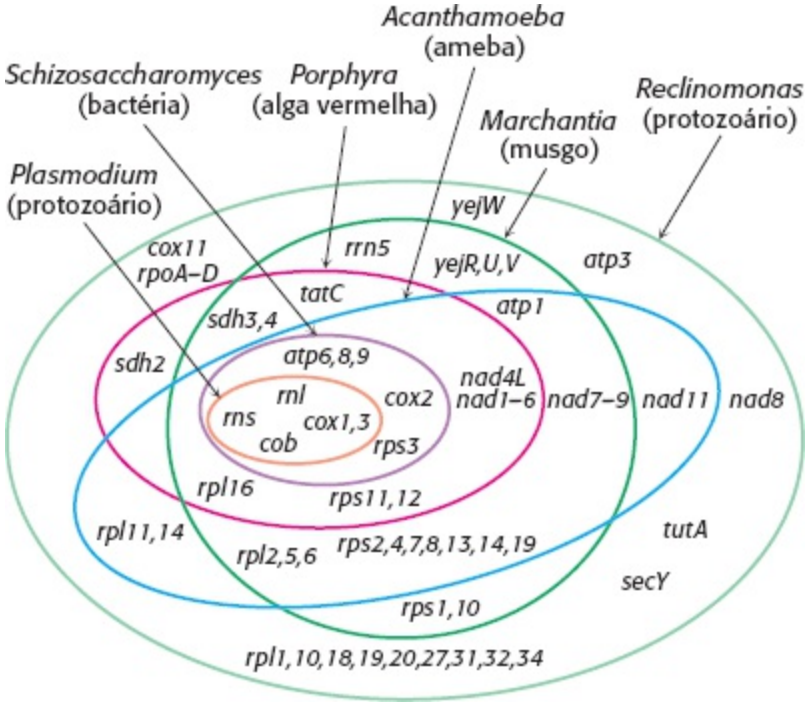


Figura 18.4 Complementos superpostos de genes de mitocôndrias. Os genes encontrados em cada oval são os encontrados no organismo representado pela oval. São mostrados apenas os genes codificadores de proteínas e rRNA. O genoma de *Reclinomonas* contém todos os genes codificadores de proteínas encontrados em todos os genomas mitocondriais sequenciados. [De M. W. Gray, G. Burger, and B. F. Lang. Science 283:1476-1481, 1999.]

As evidências de que as mitocôndrias modernas resultam de um único evento são procedentes do exame do genoma mitocondrial mais parecido com o genoma bacteriano, ou seja, do protozoário *Reclinomonas americana*. O genoma desse protozoário contém 97 genes, dos quais 62 especificam proteínas. Os genes que codificam essas proteínas incluem todos os genes codificadores de proteínas encontrados em todos os genomas mitocondriais sequenciados (Figura 18.4). Ainda assim, esse genoma codifica menos de 2% dos genes codificadores de proteínas da bactéria *E. coli*. Em outras palavras, uma pequena fração dos genes bacterianos – 2% – é encontrada em todas as mitocôndrias examinadas. Como é possível que todas as mitocôndrias apresentem os mesmos 2% do genoma bacteriano? Parece improvável que genomas mitocondriais resultantes de vários eventos endossimbióticos poderiam ser reduzidos ao mesmo conjunto de genes encontrados no protozoário *Reclinomonas americana*. Assim, a explicação mais simples é que o evento endossimbiótico ocorreu apenas uma vez e todas as mitocôndrias existentes atualmente são descendentes desse ancestral.

Observe que a "ingestão" transitória de células procarióticas por células maiores não é incomum no mundo microbiano. No tocante às mitocôndrias, essa relação transitória se tornou permanente quando a célula bacteriana perdeu seu DNA, tornando-se incapaz de vida independente, e a célula hospedeira se tornou dependente do ATP gerado por seu "inquilino".

18.2 A fosforilação oxidativa depende da transferência de elétrons

No Capítulo 17 foi identificado que a função primária do ciclo do ácido cítrico é a geração de NADH e $FADH_2$ por meio da oxidação de acetil-CoA. Na fosforilação oxidativa, elétrons de NADH e $FADH_2$ são utilizados para reduzir oxigênio molecular a água. A redução do oxigênio molecular por NADH e $FADH_2$, um processo extremamente exergônico, é realizado graças a várias reações de

transferência de elétrons que ocorrem em um conjunto de proteínas de membrana conhecidas como *cadeia de transporte de elétrons*.

O potencial de transferência de elétrons de um elétron é medido como potencial redox

Na fosforilação oxidativa, o *potencial de transferência de elétrons* de NADH e $FADH_2$ é convertido no *potencial de transferência de fosforila* de ATP. São necessárias expressões quantitativas dessas formas de energia livre. A determinação do potencial de transferência de fosforila já é conhecida: consiste no $\Delta G^{o'}$ para a hidrólise do composto fosforila ativado. A expressão correspondente para o potencial de transferência de elétrons é E'_o, o *potencial de redução* (também denominado *potencial redox* ou *potencial de oxirredução*).

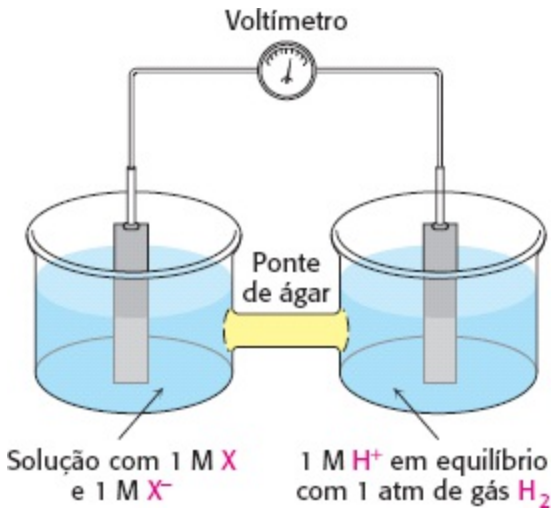


Figura 18.5 Mensuração do potencial redox. Aparelho para determinação do potencial de oxirredução padrão de um par redox. Elétrons, mas não X ou X–, conseguem fluir através da ponte de ágar.

O potencial de redução é um conceito eletroquímico. Considere uma substância que consegue existir na forma oxidada X e na forma reduzida X^-. Essa dupla é conhecida como *par redox* e é designada $X:X^-$. O potencial de redução desse par pode ser determinado pela mensuração da força eletromotiva gerada por um aparelho denominado *meia-célula amostral* conectado a *meia-célula de referência padrão* (Figura 18.5). A meia-célula amostral consiste em um eletrodo imerso em uma solução de oxidante a 1 M (X) e 1 M de redutor (X^-). A meia-célula de referência padrão consiste em um eletrodo imerso em uma solução a 1 M de H^+ que está em equilíbrio com gás H_2 a 1 atmosfera (1 atm) de pressão. Os eletrodos são conectados a um voltímetro e uma ponte de ágar possibilita que os íons se movam de uma meia-célula para outra, estabelecendo continuidade elétrica entre as meias-células. Os elétrons fluem de uma meia-célula para a outra através do arame que conecta as duas meias-células ao voltímetro. Se a reação seguir no sentido

$$X^- + H^+ \rightarrow X + \tfrac{1}{2}H_2$$

as reações nas meias-células (referidas como *meias-reações ou pares*) têm de ser

$$X^- \rightarrow X + e^- \qquad H^+ + e^- \rightarrow \tfrac{1}{2}H_2$$

Portanto, os elétrons fluem da meia-célula amostra para a meia-célula de referência padrão e o eletrodo da célula amostral é considerada negativo em relação ao eletrodo da célula padrão. *O potencial de redução do par $X:X^-$ é a voltagem observada no início do experimento* (quando X, X^-

e H^+ estão a 1 M com 1 atm de H_2). *O potencial de redução do par H^+: H_2 é definido como 0 volt.* Nas reações de oxidação-redução, o doador de elétrons, nesse caso X, é denominado agente redutor, enquanto o aceptor de elétrons, nesse caso H^+, é denominado oxidante.

O significado do potencial de redução é agora evidente. Um potencial de redução negativo significa que a forma oxidada de uma substância apresenta menor afinidade por elétrons do que H_2, como no exemplo precedente. Um potencial de redução positivo significa que a forma oxidada de uma substância tem afinidade maior por elétrons do que H_2. Essas comparações se referem às condições padrão – a saber, oxidante a 1 M, redutor a 1 M, H^+ a 1 M e 1 atm de H_2. Assim sendo, *um agente redutor forte (como NADH) doa elétrons e tem um potencial de redução negativo, enquanto um agente oxidante forte (como O_2) aceita elétrons e tem um potencial de redução positivo.*

Tabela 18.1 Potenciais de redução padrão de algumas reações.

Oxidante	Redutor	n	E'_0 (V)
Succinato + O_2	α-cetoglutarato	2	– 0,67
Acetato	Acetaldeído	2	– 0,60
Ferredoxina (oxidada)	Ferredoxina (reduzida)	1	– 0,43
2 H^+	H_2	2	– 0,42
NAD^+	NADH + H^+	2	– 0,32
$NADP^+$	NADPH + H^+	2	– 0,32
Lipoato (oxidado)	Lipoato (reduzido)	2	– 0,29
Glutationa (oxidada)	Glutationa (reduzida)	2	– 0,23
FAD	$FADH_2$	2	– 0,22
Acetaldeído	Etanol	2	– 0,20
Piruvato	Lactato	2	– 0,19
Fumarato	Succinato	2	+ 0,03
Citocromo b (+ 3)	Citocromo b (+ 2)	1	+0,07
Desidroascorbato	Ascorbato	2	+ 0,08
Ubiquinona (oxidada)	Ubiquinona (reduzida)	2	+ 0,10
Citocromo c (+3)	Citocromo c (+ 2)	1	+ 0,22
Fe (+ 3)	Fe (+ 2)	1	+ 0,77
½ O_2 + 2 H^+	H_2O	2	+ 0,82

Observação: E'_o é o potencial de oxidação-redução padrão (pH 7, 25°C) e n é o número de elétrons transferidos. E'_o é referente a reação parcial escrita como oxidante + e^- → redutor.

Os potenciais de redução de muitos pares redox biologicamente importantes são conhecidos (Tabela 18.1). A Tabela 18.1 é semelhante àquelas apresentadas em livros de química, exceto que a concentração de íon hidrogênio de 10^{-7} M (pH = 7) é usada em vez de 1 M (pH = 0), que é o estado padrão adotado pelos bioquímicos. Essa diferença é mostrada pelo apóstrofo em E'_0. É preciso lembrar que o apóstrofo em $\Delta G^{o'}$ denota uma alteração padrão da energia livre em pH 7.

A alteração da energia livre padrão ($\Delta G^{o'}$) está relacionada com a alteração no potencial de redução $\Delta E'_0$ pela fórmula

$$\Delta G^{o'} = -nF\Delta E'_0$$

na qual n é o número de elétrons transferidos, F é a constante de proporcionalidade denominada *faraday* [96,48 kJ mol^{-1} V^{-1} (23,06 kcal mol^{-1} V^{-1})], $\Delta E'_0$ é apresentado em volts e $\Delta G^{o'}$ é apresentado em quilojoules ou quilocalorias por mol.

A alteração da energia livre de uma reação de oxirredução pode ser calculada facilmente a partir dos potenciais de redução dos reagentes. Por exemplo, considere a redução de piruvato por NADH, catalisada pela lactato desidrogenase. É preciso lembrar que essa reação mantém o equilíbrio redox na fermentação do ácido láctico (ver Figura 16.11).

$$\text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{lactato} + \text{NAD}^+ \qquad \text{(A)}$$

O potencial de redução do par NAD^+: NADH, ou meia-reação, é – 0,32V, enquanto o potencial de redução do par piruvato:lactato é –0,19 V. Por convenção, os potenciais de redução (como na Tabela 18.1) referem-se às reações parciais escritas como reduções: oxidante + e^- redutor. Portanto,

$$\text{Piruvato} + 2\,\text{H}^+ + 2\,e^- \rightarrow \text{lactato} \qquad \Delta E'_0 = -0{,}19\ \text{V} \qquad \text{(B)}$$

$$\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2\,e^- \rightarrow \text{NADH} \qquad \Delta E'_0 = -0{,}32\ \text{V} \qquad \text{(C)}$$

Para obter a reação A a partir das reações B e C, é necessário inverter o sentido da reação C de modo que NADH apareça à esquerda da seta. Ao fazê-lo, o sinal de $\Delta E'_0$ tem de ser trocado.

$$\text{Piruvato} + 2\,\text{H}^+ + 2\,e^- \rightarrow \text{lactato} \qquad \Delta E'_0 = -0{,}19\ \text{V} \qquad \text{(B)}$$

$$\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2\,e^- \qquad \Delta E'_0 = +0{,}32\ \text{V} \qquad \text{(D)}$$

Para a reação B, a energia livre pode ser calculada com n = 2.

$$\Delta G^{o'} = -2 \times 96{,}48\ \text{kJ mol}^{-1}\ \text{V}^{-1} \times -0{,}19\ \text{V}$$

$$= +36{,}7\ \text{kJ mol}^{-1}\ (+8{,}8\ \text{kcal mol}^{-1})$$

Da mesma maneira, para a reação D,

$$\Delta G^{o'} = -2 \times 96{,}48\ \text{kJ mol}^{-1}\ \text{V}^{-1} \times 0{,}32\ \text{V}$$

$$= -61{,}8\ \text{kJ mol}^{-1}\ (-14{,}8\ \text{kcal mol}^{-1})$$

Portanto, a energia livre da reação A é obtida de

$$\Delta G^{o\prime} = \Delta G^{o\prime} \text{ (da reação B)} + \Delta G^{o\prime} \text{ (da reação D)}$$
$$= +36{,}7 \text{ kJ mol}^{-1} (-61{,}8 \text{ kJ mol}^{-1})$$
$$= -25{,}1 \text{ kJ mol}^{-1} (-6{,}0 \text{ kcal mol}^{-1})$$

Uma diferença de potencial de 1,14 volt entre NADH e oxigênio molecular impulsiona o transporte de elétrons ao longo da cadeia e favorece a formação de um gradiente de prótons

A força motriz da fosforilação oxidativa é o potencial de transferência de elétrons de NAH ou $FADH_2$ em comparação com o potencial de transferência de elétrons de O_2. Quanta energia é liberada pela redução de O_2 com NADH? Calculemos $\Delta G^{o\prime}$ dessa reação. As meias-reações pertinentes são

$$1/2\ O_2 + 2\ H^+ + 2\ e^- \rightarrow H_2O \qquad E'_0 = +0{,}82\ V \qquad \text{(A)}$$

$$NAD^+ + H^+ + 2\ e^- \rightarrow NADH \qquad E'_0 = -0{,}32\ V \qquad \text{(B)}$$

A combinação das duas meias-reações, como ocorre na cadeia de transporte de elétrons, fornece

$$1/2\ O_2 + NADH + H^+ \rightarrow H_2O + NAD^+ \qquad \text{(C)}$$

A energia livre padrão dessa reação é calculada da seguinte maneira:

$$\Delta G^{o\prime} = (-2 \times 96{,}48 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ V}^{-1} \times +0{,}82 \text{ V}) -$$
$$(-2 \times 96{,}48 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ V}^{-1} \times 0{,}32 \text{ V})$$
$$= -158{,}2 \text{ kJ mol}^{-1} - 61{,}9 \text{ kJ mol}^{-1}$$
$$= -220{,}1 \text{ kJ mol}^{-1} (-52{,}6 \text{ kcal mol}^{-1})$$

Essa liberação de energia livre é substancial. É preciso lembrar que $\Delta G^{o\prime}$ para a hidrólise de ATP é –30,5 kJ mol^{-1} (– 7,3 kcal mol^{-1}). A energia liberada é, a princípio, empregada na geração de um gradiente de prótons que, a seguir, é usado para a síntese de ATP e o transporte de metabólitos através da membrana mitocondrial.

Como se pode quantificar a energia associada a um gradiente de prótons? Lembre-se de que a alteração de energia livre para uma espécie que se encontra na concentração c_1 ao se movimentar para o outro lado da membrana onde se encontra na concentração c_2 é calculada da seguinte forma

$$\Delta G = RT \ln (c_2/c_1) + ZF\Delta V$$

na qual Z é a carga elétrica da espécie transportada e ΔV é o potencial transmembrana em volts (Seção 13.1). Em condições típicas para a membrana mitocondrial interna, o pH externo é 1,4 unidade mais baixo que o pH interno [correspondendo a $\ln(c_2/c_1)$ de 1,4] e o potencial de membrana é 0,14 V, com o exterior sendo positivo. Visto que Z = + 1 para prótons, a alteração da energia livre é $(8{,}32 \times 10^{-3}$ kJ mol^{-1} $V^{-1} \times 310$ K $\times$ 1,4) + (+1 $\times$ 96,48 kJ mol^{-1} $V^{-1} \times$ 0,14 V) = 21,8 kJ (5,2 kcal mol^{-1}). Portanto, cada próton que é transportado da matriz para o lado citoplasmático corresponde a 21,8 kJ mol^{-1} de energia livre.

18.3 A cadeia respiratória é constituída por quatro complexos: três bombas de prótons e uma ligação física com o ciclo do ácido cítrico

Os elétrons são transferidos de NADH para O_2 por meio de uma cadeia de três grandes complexos proteicos denominados *NADH-coenzima Q oxidorredutase*, *coenzima Q-citocromo c oxidorredutase e citocromo c oxidase* (Figura 18.6 e Tabela 18.2). *O fluxo de elétrons nesses complexos transmembrana resulta no transporte de prótons através da membrana mitocondrial interna*. Um quarto complexo proteico grande, denominado *succinato-coenzima Q redutase*, contém a succinato desidrogenase que gera $FADH_2$ no ciclo do ácido cítrico. Elétrons provenientes desse $FADH_2$ entram na cadeia de transporte de elétrons na citocromo Q oxidorredutase. A succinato-coenzima Q redutase, ao contrário dos outros complexos, não bombeia prótons. NADH-coenzima Q oxidorredutase, succinato-coenzima Q redutase, coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase e citocromo *c* oxidase também são também denominadas c*omplexos I, II, III e IV*, respectivamente. Os complexos I, II e III parecem estar associados em um complexo supramolecular denominado *respirassoma*. Como já foi demonstrado, esses complexos supramoleculares facilitam a transferência rápida de substrato e evitam a liberação de intermediários de reações.

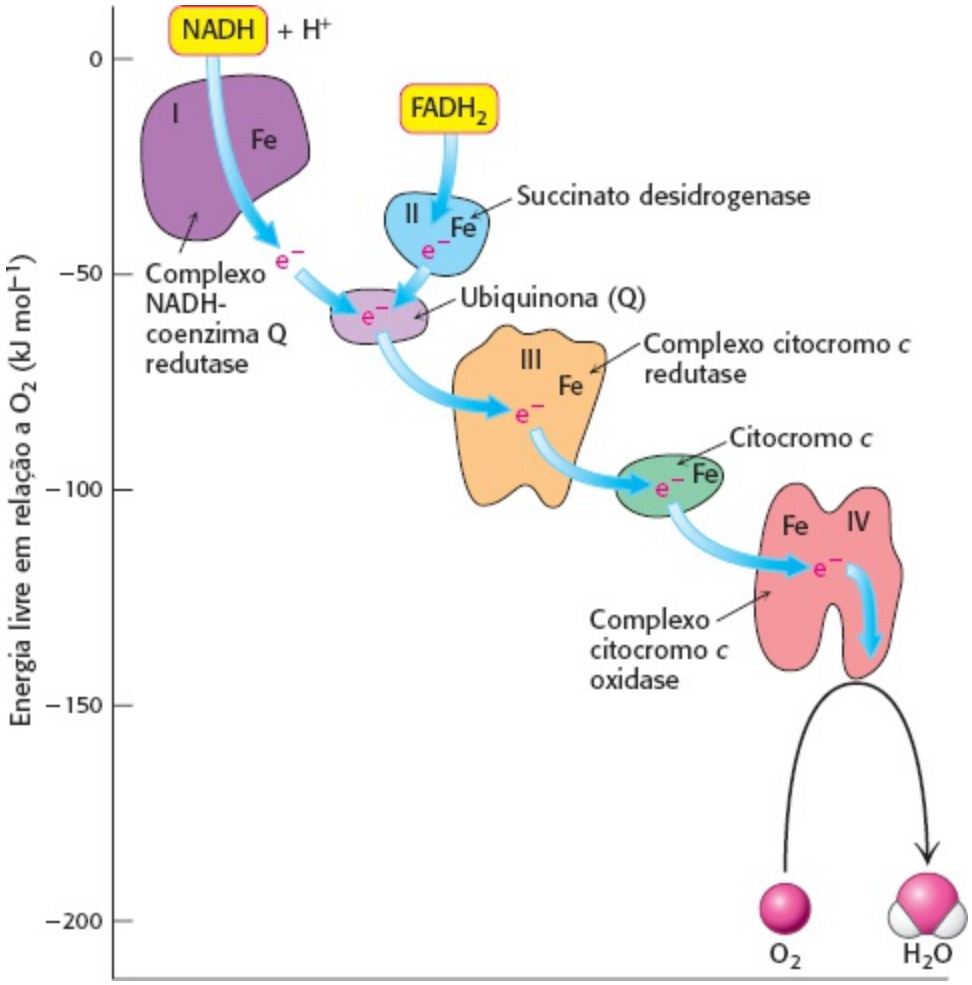


Figura 18.6 Componentes da cadeia de transporte de elétrons. Os elétrons fluem a favor do gradiente de energia de NADH para O_2. O fluxo é catalisado por quatro complexos proteicos. Ferro é um componente dos complexos I, III e IV e do citocromo *c*. [De D. Sadava *et al.*, Life, 8th ed. (Sinauer, 2008), p. 150.]

Dois carreadores de elétrons especiais transportam os elétrons de um complexo para outro. O primeiro é a *coenzima Q* (Q), também conhecida como *ubiquinona* por ser uma *quinona* ubíqua nos sistemas biológicos. A ubiquinona é uma quinona hidrofóbica que se difunde rapidamente na membrana mitocondrial interna. Os elétrons são carreados de NADH-coenzima Q oxidorredutase para a coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase, o segundo complexo da cadeia, pela forma reduzida

da coenzima Q. Elétrons provenientes do $FADH_2$, gerados pelo ciclo do ácido cítrico, são transferidos primeiramente para a ubiquinona e, depois, para o complexo coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase.

Tabela 18.2 Componentes da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.

					Oxidante ou redutor	
Complexo enzimático	Massa (kDa)	Subunidades	Grupo prostético	Lado da matriz	Cerne da membrana	Lado citoplasmático
NADH-coenzima Q oxidorredutase	> 900	46	FMN Fe-S	NADH	Q	
Succinato-coenzima Q redutase	140	4	FAD Fe-S	Succinato	Q	
Coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase	250	11	Heme b_H Heme b_L Heme c_1 Fe-S		Q	Citocromo *c*
Citocromo *c* oxidase	160	13	Heme *a* Heme a_3 Cu_A e Cu_B			Citocromo *c*

Fonte: J. W. DePierre and L. Ernster. Annu. Rev. Biochem. 46:215, 1977; Y. Hatefi. Annu. Rev. Biochem. 54:1015, 1985; and J. E. Walker. Q. Rev. Biophys.25:253, 1992.

A coenzima Q é um derivado de quinona com uma cauda longa constituída por subunidades isopreno com cinco carbonos que são responsáveis por sua natureza hidrofóbica. O número de unidades isopreno na cauda depende da espécie. A forma mais comum em mamíferos contém 10 unidades isopreno (coenzima Q_{10}). Para simplificar, o subscrito será omitido dessa abreviatura porque todas as variedades funcionam de maneira semelhante. As quinonas existem em três estados de oxidação. No estado plenamente oxidado (Q), a coenzima Q apresenta dois grupos ceto (Figura 18.7). O acréscimo de um elétron e um próton resulta na forma semiquinona ($QH\cdot$). A semiquinona pode perder um próton e formar um ânion semiquinona ($Q\cdot^-$). O acréscimo de um segundo elétron e um segundo próton à semiquinona gera ubiquinol (QH_2), a forma plenamente reduzida da coenzima Q, que "prende" mais fortemente seus prótons. Assim sendo, *no caso das quinonas, as reações de transferência de elétrons são acopladas à ligação e à liberação de prótons*, uma propriedade que é essencial ao transporte transmembrana de prótons. Visto que a ubiquinona é solúvel na membrana, acredita-se que exista um acúmulo de Q e QH_2 – o *pool de Q* – na membrana mitocondrial interna.

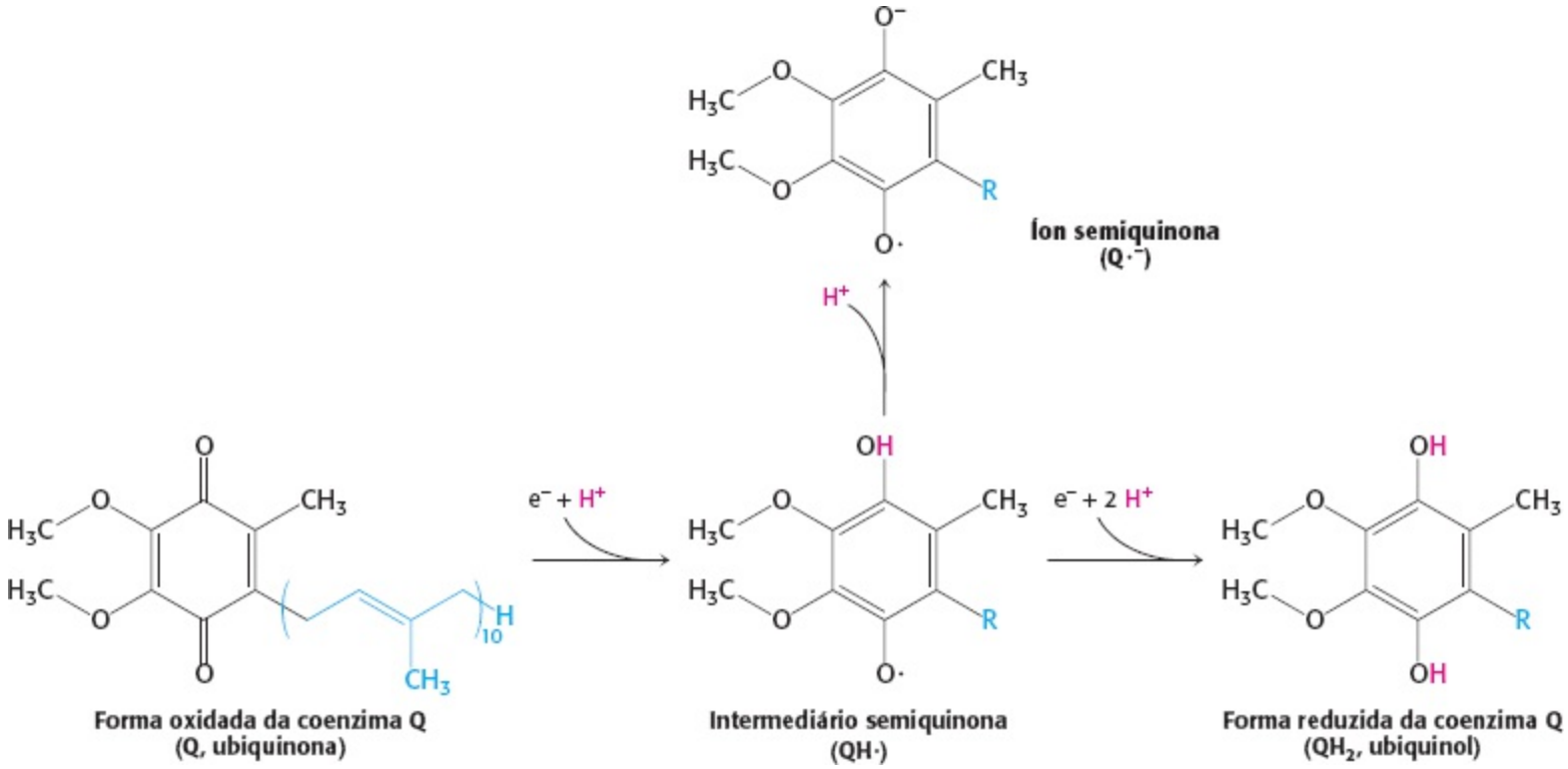


Figura 18.7 Estados de oxidação das quinonas. A redução da ubiquinona (Q) a ubiquinol (QH_2) ocorre por meio de um intermediário semiquinona ($QH\cdot$).

Ao contrário da coenzima Q (Q), o segundo carreador de elétrons especial é uma proteína. Citocromo *c*, uma pequena proteína solúvel, carreia elétrons da coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase para citocromo *c* oxidase, o componente final na cadeia e o responsável por catalisar a redução de O_2.

Os elétrons de alto potencial do NADH entram na cadeia respiratória na NADH-coenzima Q oxidorredutase

Os elétrons de NADH entram na cadeia em *NADH-coenzima Q oxidorredutase* (também denominado *complexo I* e *NADH desidrogenase*), uma enzima "enorme" (> 900 kDa) que é constituída por aproximadamente 46 cadeias polipeptídicas. Essa bomba de prótons, como a das outras duas na cadeia respiratória, é codificada por genes localizados nas mitocôndrias e no núcleo. NADH-coenzima Q oxidorredutase tem o formato da letra L, com um ramo horizontal na membrana e um ramo vertical que se projeta para a matriz.

A reação catalisada por essa enzima para ser:

$$\text{NADH} + \text{coenzima Q} + 5\ \text{H}^+_{\text{matriz}} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{QH}_2 + 4\ \text{H}^+_{\text{citoplasma}}$$

A etapa inicial consiste na ligação do NADH e na transferência de seus dois elétrons de alto potencial para o grupo prostético *flavina mononucleotídio* (FMN) desse complexo, dando origem a forma reduzida, $FMNH_2$ (Figura 18.8). O aceptor de elétrons de FMN, o anel isoaloxazínico, é idêntico ao do FAD.

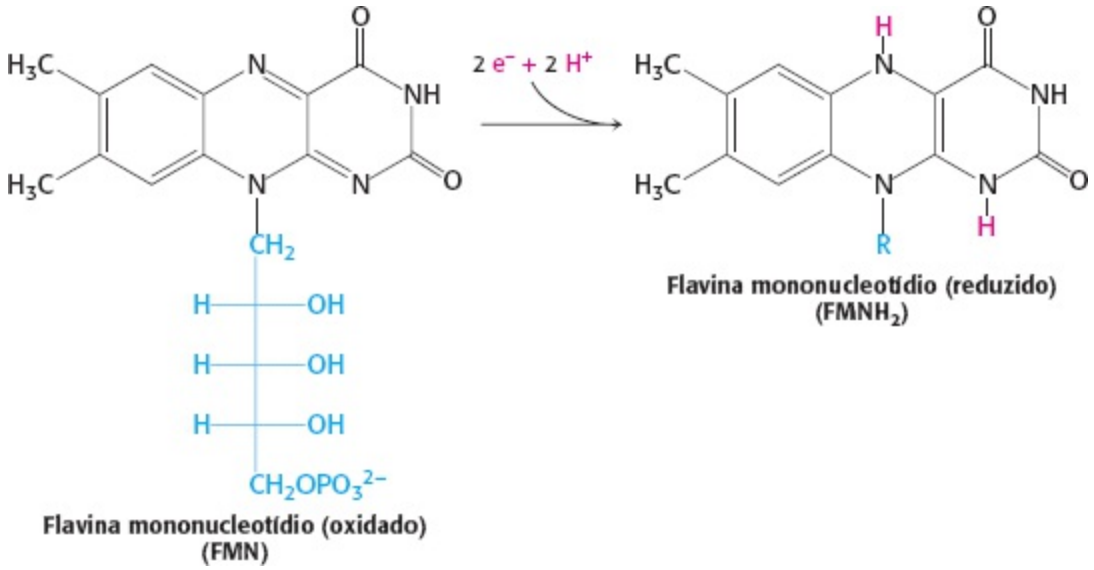


Figura 18.8 Estados de oxidação das flavinas.

A seguir, os elétrons são transferidos de $FMNH_2$ para uma série de *clusters de ferro-enxofre*, o segundo tipo de grupo prostético na NADH-coenzima Q oxidorredutase. Os *clusters* (agregados) de ferro e enxofre (Fe-S) nas metaloproteínas, *proteínas ferro-enxofre* (*proteínas não hêmicas*), têm uma participação crítica em uma ampla gama de reações de redução nos sistemas biológicos. Vários tipos de *clusters* de Fe-S são conhecidos (Figura 18.9). No tipo mais simples um único íon ferro apresenta coordenação tetraédrica com os grupos sulfidrila de quatro resíduos de cisteína da proteína. Um segundo tipo – 2Fe-2S – contém dois íons ferro, dois sulfitos inorgânicos e, em geral, quatro resíduos cisteína. Um terceiro tipo, denominado 4Fe-4S, contém quatro íons ferro, quatro sulfitos inorgânicos e quatro resíduos de cisteína. A NADH-coenzima Q oxidorredutase contêm *clusters* 2Fe-2S assim como *clusters* 4Fe-4S. Os íons ferro nesses complexos Fe-S se alternam entre os estados Fe^{2+} (reduzido) e Fe^{3+} (oxidado). Ao contrário das quinonas e das flavinas, os *clusters* de ferro e enxofre geralmente sofrem reações de oxidação-redução sem liberar ou se ligar a prótons.

Todas as reações de oxidação-redução ocorrem na parte extramembrana da NADH-coenzima Q oxidorredutase. Embora os detalhes da transferência de elétrons por meio desse complexo ainda estejam sendo investigados, NADH flagrantemente se liga a um sítio no domínio extramembranar. NADH transfere seus dois elétrons para FMN. Esses elétrons fluem através de vários centros Fe-S e, depois, seguem para a coenzima Q. *O fluxo de dois elétrons de NADH para a coenzima Q através da NADH-coenzima Q oxidorredutase resulta no bombeamento de quatro íons hidrogênio para fora da matriz da mitocôndria. Ao aceitar dois elétrons a ubiquinona (Q) capta dois prótons da matriz, sendo reduzida a ubiquinol (QH_2)* (Figura 18.10). O ubiquinol (QH_2) sai da enzima para o interior hidrofóbico da membrana.

É importante mencionar que o ciclo do ácido cítrico não é a única fonte de NADH mitocondrial. Como veremos no Capítulo 22, a degradação dos ácidos graxos, que também ocorre nas mitocôndrias, é outra fonte crucial de NADH para a cadeia de transporte de elétrons. Além disso, o NADH gerado no citoplasma pode ser transportado para dentro das mitocôndrias para uso na cadeia de transporte de elétrons (Seção 18.5).

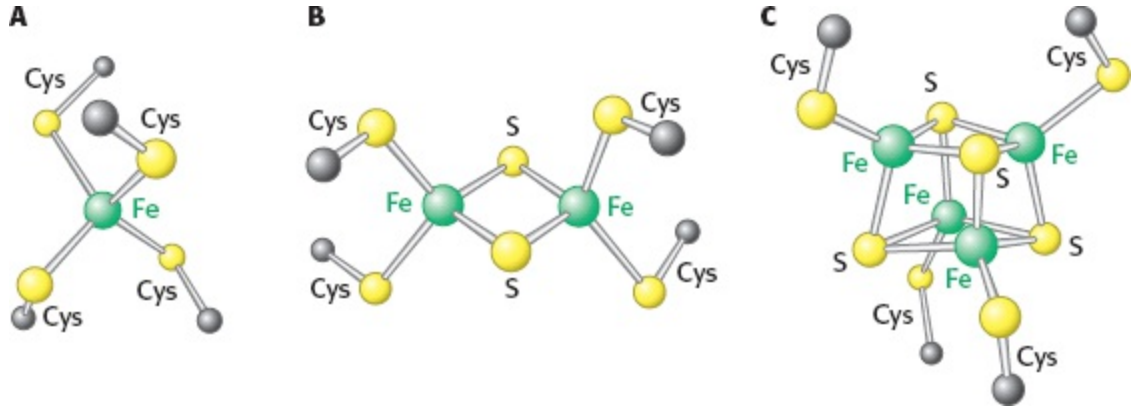


Figura 18.9 Agregados (*clusters*) ferroenxofre. **A.** Um único íon de ferro ligado por quatro resíduos de cisteína. **B.** Agregado 2Fe-2S com íons ferro ligados por íons sulfeto. **C.** Agregado 4Fe-4S. Cada um desses agregados pode sofrer reações de oxirredução.

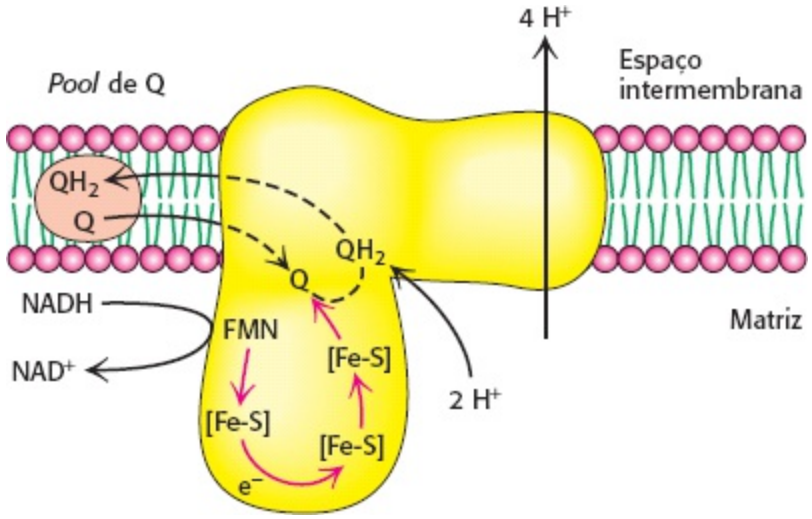


Figura 18.10 Reações de transferência de elétrons e prótons acopladas através da NADH-coenzima Q oxidorredutase. Os elétrons fluem no complexo I de NADH, através de FMN e vários *clusters* de ferro e enxofre, para a ubiquinona (Q). O fluxo de elétrons (setas vermelhas) resulta no bombeamento de quatro prótons e na captação de dois prótons da matriz mitocondrial. [Com base em U. Brandt *et al. FEBS Letters* 545:9-17, 2003, Fig. 2.]

Ubiquinol é o ponto de entrada para elétrons oriundos de $FADH_2$ das flavoproteínas

$FADH_2$ entra na cadeia de transporte de elétrons no segundo complexo proteico da cadeia. É preciso lembrar que $FADH_2$ é formado no ciclo do ácido cítrico, na oxidação de succinato a fumarato pela succinato desidrogenase (Seção 17.2). A succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo do ácido cítrico, faz parte do complexo *succinato-coenzima Q redutase* (*complexo II*), uma proteína integral da membrana mitocondrial interna. $FADH_2$ não deixa o complexo. Seus elétrons são transferidos para os centros de Fe-S e, depois, para ubiquinona (Q) para formar ubiquinol (QH_2), que depois está pronto para transferir elétrons pela cadeia de transporte de elétrons. O complexo succinato-coenzima Q redutase, ao contrário da NADH-coenzima Q oxidorredutase, não bombeia prótons de um lado da membrana para outro. Por conseguinte, menos ATP é formado a partir da oxidação de $FADH_2$ do que a partir de NADH.

Duas outras enzimas que descreveremos posteriormente, *glicerol fosfato desidrogenase* (p. 555) e *acil-CoA desidrogenase dos ácidos graxos* (Seção 22.2), também transferem seus elétrons de alto potencial de $FADH_2$ para ubiquinona (Q) para formar ubiquinol (QH_2), o estado reduzido da ubiquinona. Essas enzimas oxidam, respectivamente, glicerol e gorduras, fornecendo elétrons para a

fosforilação oxidativa. Essas enzimas também não bombeiam prótons.

Os elétrons fluem do ubiquinol para citocromo *c* por meio da coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase

Qual é o destino do ubiquinol gerado pelos complexos I e II? Os elétrons do ubiquinol (QH_2) são passados para o citocromo c pela segunda das três bombas de prótons na cadeia respiratória, a *coenzima Q-citocromo c oxidorredutase* (também conhecida como c*omplexo III* e *citocromo redutase*). A função da coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase é catalisar a transferência de elétrons do ubiquinol (QH_2) para o *citocromo c* oxidado (Cit *c*), uma proteína hidrossolúvel, e, ao mesmo tempo, bombear prótons para fora da matriz mitocondrial. O fluxo de um par de elétrons através desse complexo resulta no transporte efetivo de $2H^+$ para o lado citoplasmático, metade da produção da NADH-coenzima Q oxidorredutase por causa da menor força impulsora termodinâmica.

$$QH_2 + 2\ \text{Cit}\ c_{ox} + 2\ H^+_{matriz} \rightarrow Q + 2\ \text{Cit}\ c_{red} + 4\ H^+_{citoplasma}$$

A própria coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase contém dois tipos de citocromos, denominados *b* e c_1 (Figura 18.11). *Um citocromo é uma proteína que transfere elétrons e contém um grupo prostético heme*. O íon ferro de um citocromo alterna entre um estado reduzido ferroso (2+) e um estado oxidado ferrico (+3) durante o transporte de elétrons. As duas subunidades citocromo da coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase contém um total de três hemes: dois hemes no interior do citocromo *b*, denominados b_L (para baixa [*low*] afinidade) e heme b_H (para alta [*high*] afinidade), e um heme no interior do citocromo c_1. O grupo prostético heme nos citocromos *b*, c_1 e *c* é a ferro-protoporfirina IX, o mesmo heme encontrado na mioglobina e na hemoglobina (Seção 7.1). Esses hemes idênticos apresentam diferentes afinidades por elétrons porque se encontram em ambientes polipeptídicos diferentes. Por exemplo, heme b_L, que está localizado no *cluster* de hélices próximo ao lado citoplasmático da membrana, apresenta menor afinidade por um elétron do que heme b_H, que está perto do lado da matriz. A coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase também é conhecida como citocromo bc_1 por causa de seus grupos de citocromos.

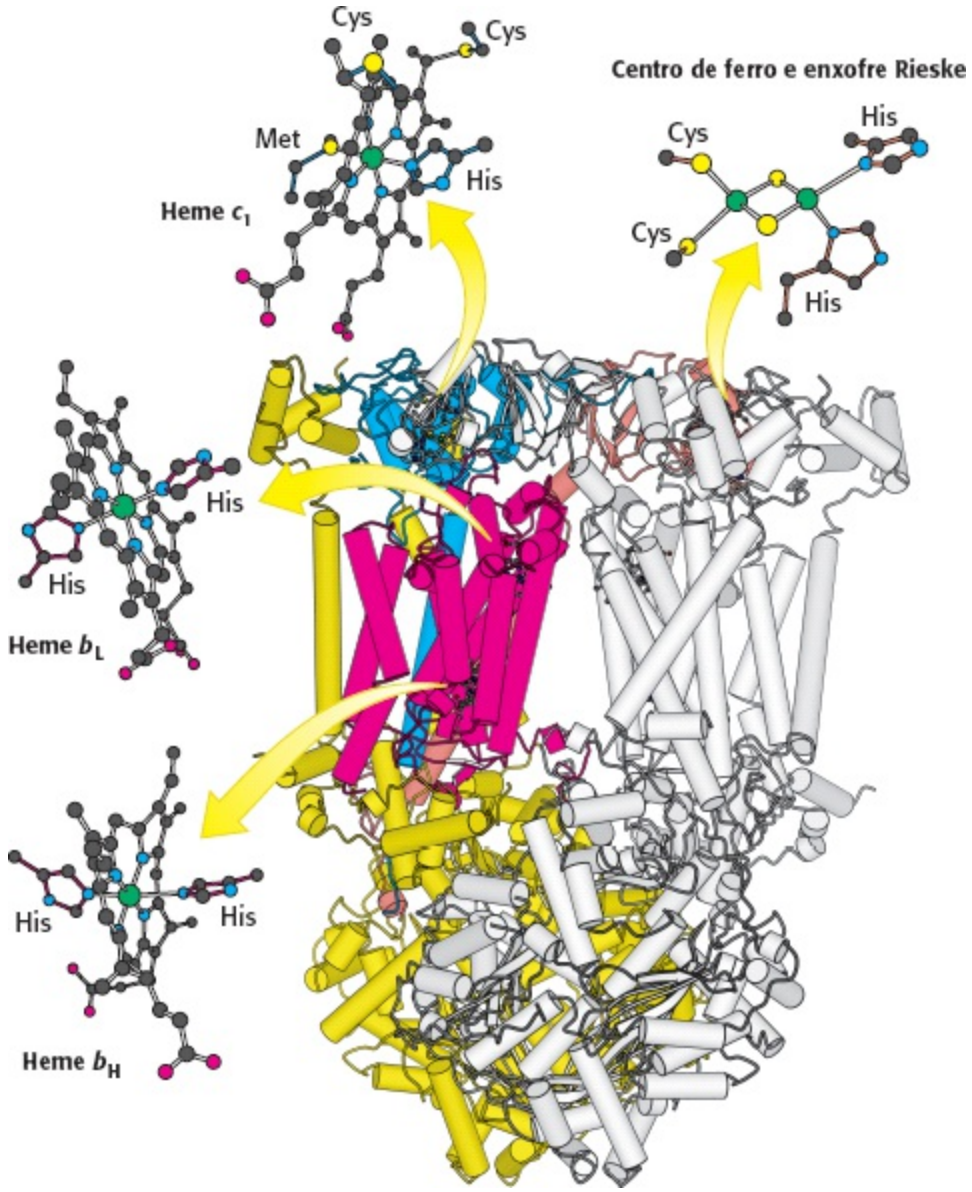


Figura 18.11 Estrutura da coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase (citocromo bc_1). Essa enzima é um homodímero com 11 cadeias polipeptídicas distintas. *Observe* que os principais grupos prostéticos, três hemes e um *cluster* 2Fe-2S, estão localizados próximo à borda citoplasmática do complexo que margeia o espaço intermembrana (topo) ou na região embebida na membrana (as α-hélices estão representadas por tubos). Eles estão bem posicionados para mediar as reações de transferência de elétrons entre quinonas na membrana e o citocromo *c* no espaço intermembrana. [Desenhada a partir de 1BCC.pdb.]

Além dos hemes, a enzima contém uma metaloproteína ferro-enxofre com um centro 2Fe-2S. Esse centro, denominado *centro de Rieske*, é incomum porque um dos íons ferro é coordenado por dois resíduos de histidina em vez de por dois resíduos de cisteína. Essa coordenação estabiliza o centro em sua forma reduzida, elevando seu potencial de redução de modo que consiga aceitar prontamente elétrons de QH_2.

O ciclo Q direciona os elétrons de um transportador de dois elétrons para um transportador de um elétron e bombeia prótons

O ubiquinol (QH_2) passa dois elétrons para a coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase; contudo, o aceptor de elétrons nesse complexo, o citocromo c, só consegue aceitar um elétron. Como ocorre a troca do ubiquinol, transportador de dois elétrons, para o citocromo c, que só transporta um elétron? O mecanismo do acoplamento da transferência de elétrons de Q para o citocromo *c* para o transporte

transmembrana de prótons é denominado *ciclo Q* (Figura 18.12). Duas moléculas QH_2 se ligam ao complexo consecutivamente, cada uma doando dois elétrons e dois H^+. *Esses prótons são liberados para o lado citoplasmático da membrana.* O primeiro ubiquinol (QH_2) que sai do *pool* de Q se liga ao primeiro sítio de ligação de Q (Q_o) e seus dois elétrons movemse através do complexo para destinos diferentes. Um elétron flui, primeiro, para o *cluster* 2Fe-2S do centro de Rieske; depois flui para o citocromo c_1 e, finalmente, para uma molécula de citocromo oxidado, convertendo-o a sua forma reduzida. A molécula reduzida de citocromo *c* está livre para se difundir para fora da enzima e avançar na cadeia respiratória.

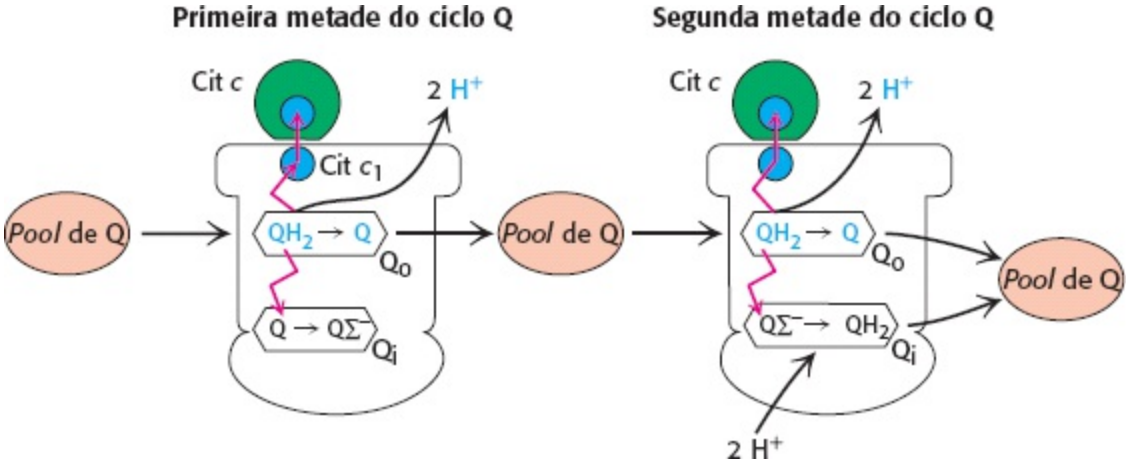


Figura 18.12 Ciclo Q. O ciclo Q ocorre no complexo III, que é representado pela figura contornada. Na primeira metade do ciclo, dois elétrons do ubiquinol (QH_2) ligado são transferidos, um para o citocromo *c* e o outro para a ubiquinona (Q) conectada a um segundo sítio de ligação para formar o ânion radical semiquinona $Q.^-$. A ubiquinona (Q) recém-formada se dissocia e entra no reservatório (*pool*) de Q. Na segunda metade do ciclo, um segundo ubiquinol (QH_2) também cede seus elétrons para o complexo II, um para a segunda molécula de citocromo *c* e o outro para reduzir $Q.^-$. a ubiquinol (QH_2). Essa segunda transferência de elétrons resulta na captação de dois prótons a partir da matriz. O trajeto da transferência de elétrons é mostrado em vermelho.

O segundo elétron passa através de dois grupamentos heme do citocromo *b* para uma ubiquinona oxidada em um segundo sítio de ligação Q (Q_i). O Q no segundo sítio de ligação é reduzido a um ânion semiquinona ($Q^{\cdot -}$.) pelo elétron proveniente do primeiro ubiquinol (QH_2). A forma agora plenamente oxidada da coenzima Q (Q) deixa o primeiro sítio de ligação, livre para reentrar no *pool* de Q.

Uma segunda molécula de QH_2 conecta-se ao sítio Q_o de coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase e reage do mesmo modo que a primeira. Um dos elétrons é transferido para o citocromo *c*. O segundo elétron passa através de dois grupos heme de citocromo *b* para a ubiquinona parcialmente reduzida no sítio de ligação Q_i. Na adição de elétron proveniente da segunda molécula de QH_2, esse ânion quinona capta dois prótons do lado da matriz para formar QH_2. *A retirada desses dois prótons da matriz contribui para a formação do gradiente de prótons.* No todo, quatro prótons são liberados no lado citoplasmático e dois prótons são removidos da matriz mitocondrial.

$$2\ QH_2 + Q + 2\ \text{Cit}\ c_{ox} + 2\ H^+_{\text{matriz}} \rightarrow 2\ Q + QH_2 + 2\text{Cit}\ c_{red} + 4\ H^+_{\ \text{citoplasma}}$$

Em um ciclo Q duas moléculas QH_2 são oxidadas para formar duas moléculas de Q e, a seguir, uma molécula Q é reduzida a QH_2. O problema de como direcionar eficientemente elétrons de um carreador de dois elétrons (QH_2) para um carreador de um elétron (citocromo *c*) é solucionado pelo ciclo Q. O componente citocromo b da redutase é, em essência, um dispositivo de reciclagem que

possibilita a utilização efetiva dos dois elétrons provenientes de QH_2.

A citocromo *c* oxidase catalisa a redução de oxigênio molecular a água

O último dos três complexos bombeadores de prótons da cadeia respiratória é *citocromo c oxidase (complexo IV)*. A citocromo *c* oxidase catalisa a transferência de elétrons da forma reduzida do citocromo *c* para o oxigênio molecular, o aceptor final.

$$4\ \text{Cit}\ c_{\text{red}} + 8\ H^+_{\text{matriz}} + \rightarrow 4\ \text{Cit}\ c_{\text{ox}} + 2\ H_2O + 4\ H^+_{\text{citoplasma}}$$

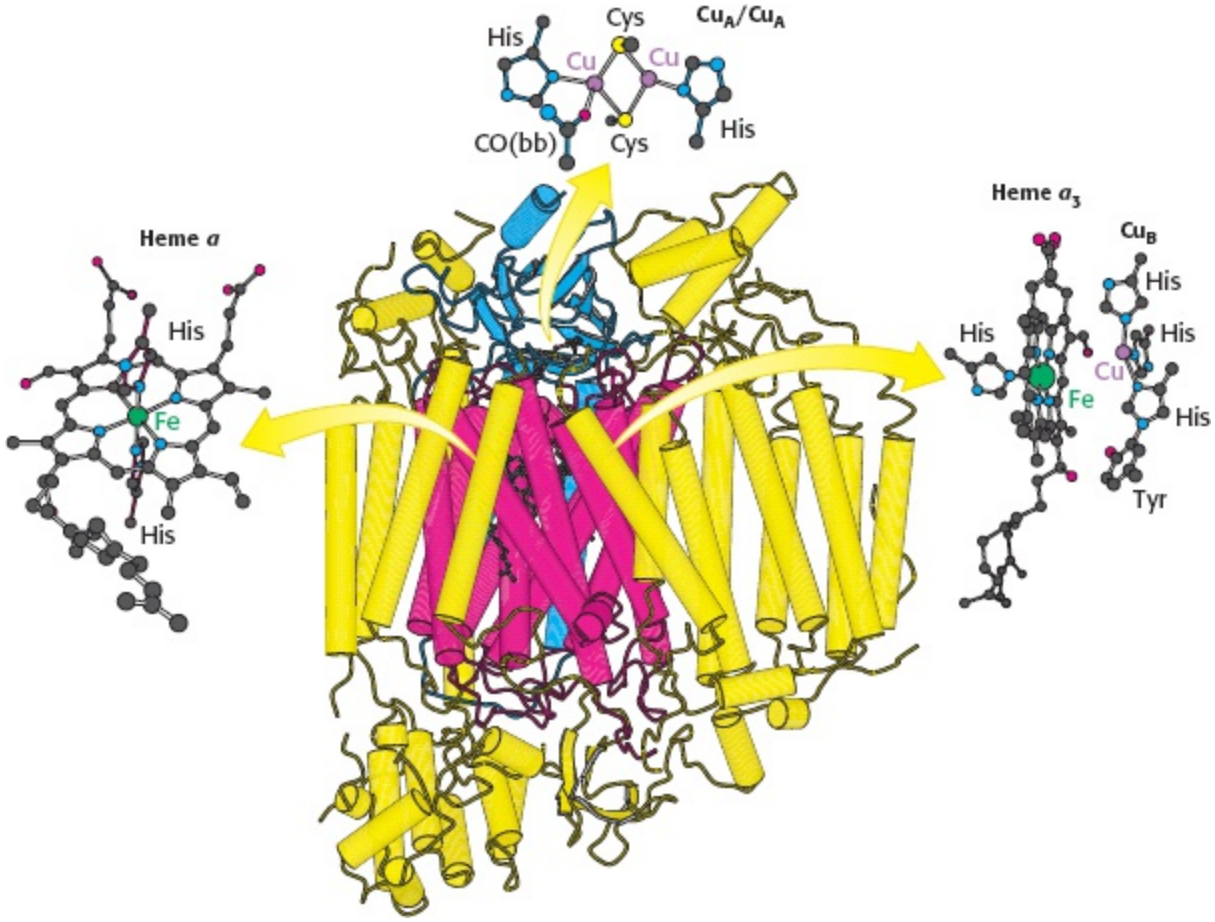
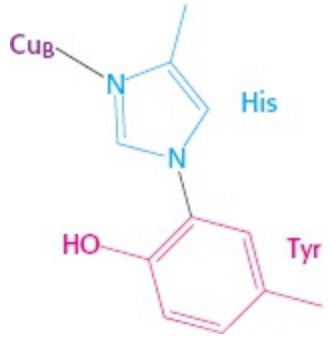


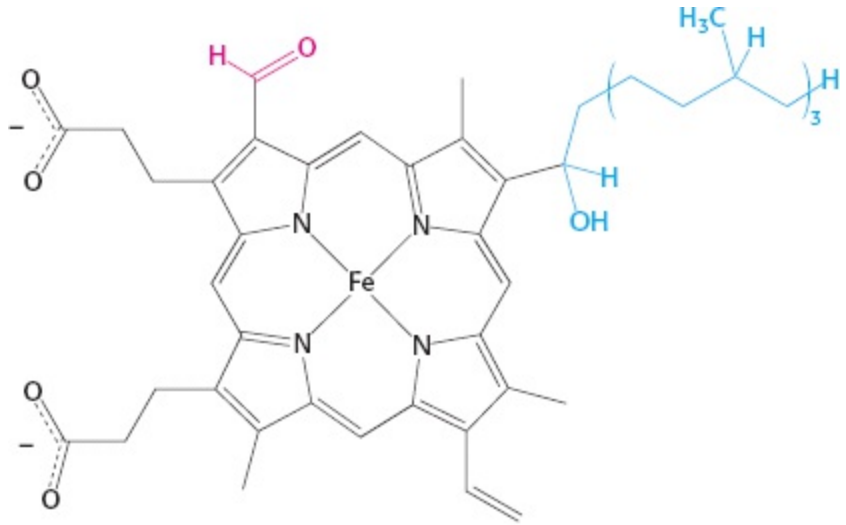
Figura 18.13 Estrutura da citocromo *c* oxidase. Esta enzima consiste em 13 cadeias polipeptídicas. Observe que a maior parte do complexo, assim como dois importantes grupos prostéticos (heme a e heme a_3-Cu_B), estão embebidos na membrana (as α-hélices são representadas por tubos verticais). O heme a_3-CU_B é o sítio de redução de oxigênio a água. O grupo prostético Cu_A/Cu_A está posicionado próximo ao espaço intermembrana, podendo melhor aceitar elétrons do citocromo *c*. CO (bb) é um grupo carbonila do arcabouço peptídico. [Desenhada a partir de 20CC.pdb.]

A demanda de oxigênio para essa reação é o que torna "aeróbicos" os organismos aeróbios. Obter oxigênio para essa reação é o motivo pelo qual o ser humano precisa respirar. Quatro elétrons são direcionados para O_2 para reduzi-lo completamente a H_2O e, ao mesmo tempo, prótons são bombeados da matriz para o lado citoplasmático da membrana mitocondrial interna. Essa reação é termodinamicamente muito favorável. A partir dos potenciais de redução apresentados na Tabela 18.1, calcula-se que a alteração da energia livre padrão dessa reação é $\Delta G^{o\prime} = -231{,}8$ kJ mol^{-1} (–55,4 kcal mol^{-1}). O máximo dessa energia livre precisa ser capturado na forma de um gradiente de prótons para utilização subsequente na síntese de ATP.



A citocromo *c* oxidase bovina é razoavelmente bem compreendida em nível estrutural (Figura 18.13). A citocromo *c* oxidase bovina é constituída por 13 subunidades, três das quais codificadas pelo genoma da própria mitocôndria. A citocromo *c* oxidase contém dois grupos *heme A* e três *íons cobre*, arranjados na forma de dois centros de cobre, designados A e B. Um centro, Cu_A/Cu_A, contém dois íons cobre conectados por dois resíduos de cisteína. Esse centro inicialmente aceita elétrons provenientes do citocromo *c* reduzido. O íon cobre remanescente, Cu_B, é coordenado por três resíduos de histidina, um dos quais é modificado por uma ligação covalente a um resíduo de tirosina. Os centros de cobre alternam-se entre a forma Cu^+ reduzida (cuprosa) e a forma Cu^{2+} (cúprica) enquanto aceitam e doam elétrons.

Existem duas moléculas heme A, denominadas *heme a* e *heme* a_3, na citocromo *c* oxidase. Heme A difere do heme nos citocromos *c* e c_1 de três maneiras: (1) um grupo formila substitui um grupo metila; (2) uma cadeia de hidrocarboneto ^{17}C substitui um dos grupos vinila e (3) o heme não está ligado de forma covalente à proteína.



Heme A

Heme *a* e heme a_3 têm potenciais de oxirredução diferentes porque estão localizados em ambientes diferentes na citocromo *c* oxidase. Um elétron flui do citocromo *c* para Cu_A/Cu_A, para heme *a*, para heme a_3, para Cu_B e, por fim, para o O_2. Heme a_3 e Cu_B estão diretamente adjacentes. Juntos, *heme* a_3 e Cu_B formam o centro ativo no qual O_2 é reduzido a H_2O.

Quatro moléculas de citocromo *c* se ligam, de modo consecutivo, à enzima e transferem um elétron para reduzir uma molécula de O_2-H_2O (Figura 18.14).

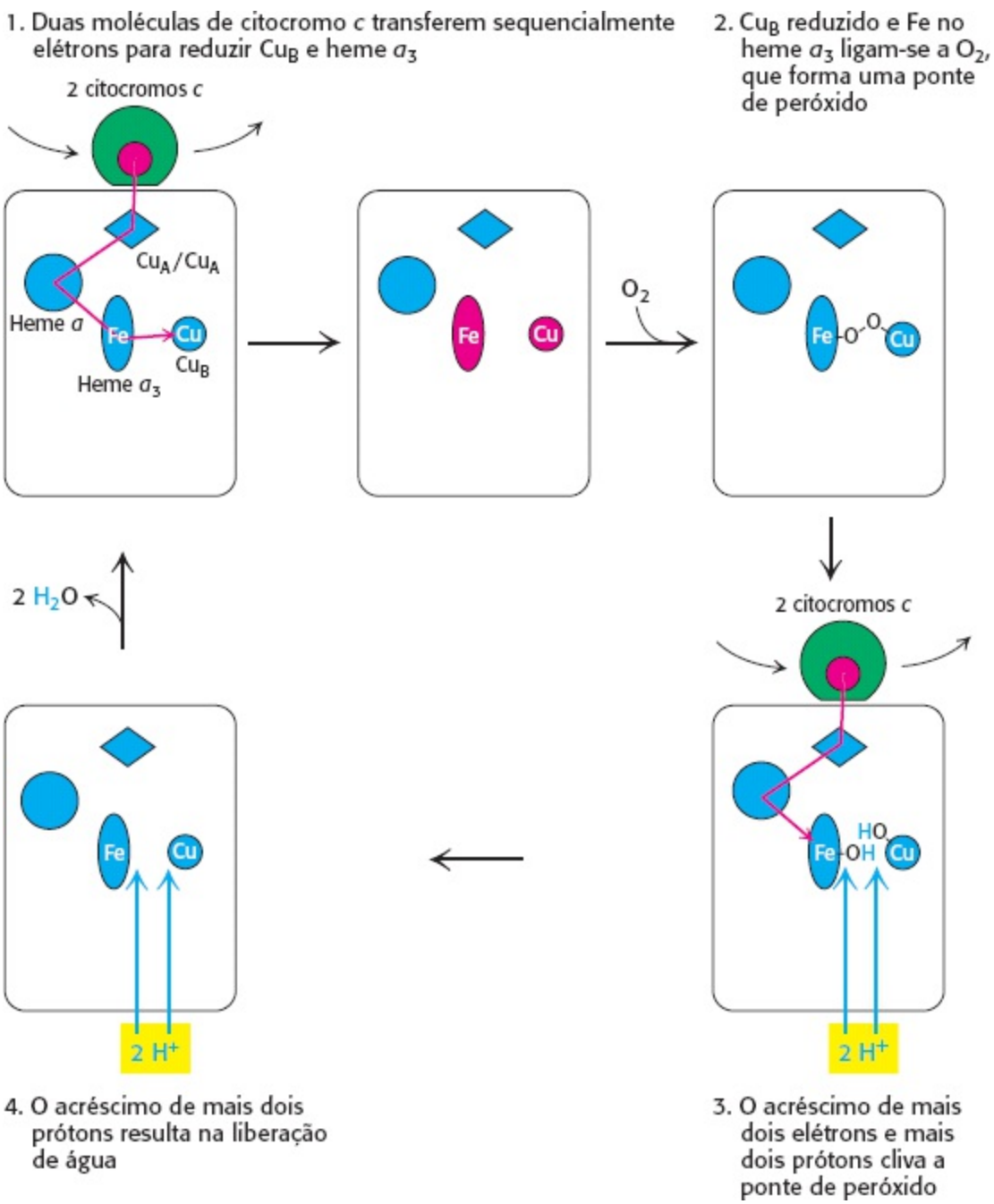


Figura 18.14 Mecanismo da citocromo *c* oxidase. O ciclo começa e termina com todos os grupos prostéticos em suas formas oxidadas (mostrados em azul). As formas reduzidas são mostradas em vermelho. Quatro moléculas de citocromo *c* doam quatro elétrons, os quais, ao possibilitar a ligação e a clivagem de uma molécula de O_2, também torna possível a importação de quatro H^+ da matriz para formar duas moléculas de H_2O, que são liberadas da enzima para regenerar o estado inicial.

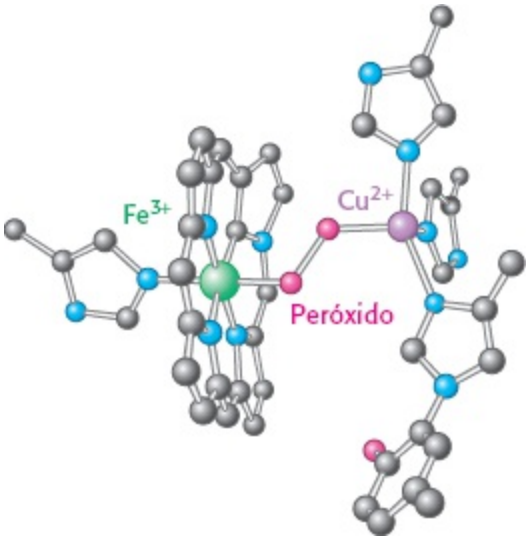


Figura 18.15 Ponte de peróxido. O oxigênio ligado ao heme a_3 é reduzido a peróxido pela presença de Cu_B.

1. Elétrons de duas moléculas de citocromo *c* reduzido fluem por uma via de transferência de elétrons na citocromo *c* oxidase, uma parando em Cu_B e a outra parando em heme a_3. Com os dois centros no estado reduzido, eles agora juntos conseguem se ligar a uma molécula de oxigênio.

2. Quando o oxigênio molecular se liga, retira um elétron de cada um dos íons próximos no centro ativo para formar uma ponte de peróxido (O_2^{2-}) entre eles (Figura 18.15).

3. Duas outras moléculas de citocromo *c* se ligam e liberam elétrons que se deslocam para o centro ativo. A adição de um elétron, assim como de H^+, a cada átomo de oxigênio reduz os dois grupos de íons oxigênio a Cu_B^{2+} OH e Fe^{3+}–OH.

4. A reação com mais dois íons H^+ possibilita a liberação de duas moléculas de H_2O e recoloca a enzima em sua forma inicial totalmente oxidada.

$$4\ \text{Cit}\ c_{red} + 4\ H^+_{matriz} + O_2 \rightarrow 4\ \text{Cit}\ c_{ox} + 2\ H_2O$$

Os quatro prótons nessa reação provêm exclusivamente da matriz. Assim, o consumo desses quatro prótons contribui diretamente para o gradiente de prótons. É preciso lembrar que cada próton contribui com 21,8 kJ mol^{-1} (5,2 kcal mol^{-1}) para a energia livre associada ao gradiente de prótons, de modo que esses quatro prótons contribuem com 87,2 kJ mol^{-1} (20,8 kcal mol^{-1}), uma quantidade substancialmente menor que a energia livre disponível a partir da redução de oxigênio a água. Qual é o destino dessa energia? É importante mencionar que a *citocromo c oxidase utiliza essa energia para bombear quatro prótons adicionais da matriz para o lado citoplasmático da membrana no curso de cada ciclo de reação para um total de oito prótons removidos da matriz* (Figura 18.16). Ainda estão sendo estudados os detalhes sobre como esses prótons são transportados através da proteína. Ainda assim, dois efeitos contribuem para o mecanismo. Primeiro, a neutralidade de carga elétrica tende a ser mantida no interior das proteínas. Assim, o acréscimo de um elétron a um sítio dentro da proteína tende a favorecer a ligação do H^+ a um sítio próximo. Segundo, ocorrem alterações conformacionais, sobretudo em torno do centro heme a_3-Cu_B, durante o ciclo da reação. Presumivelmente, em uma conformação, os prótons penetram na proteína exclusivamente pela parte do lado da matriz, enquanto na outra os prótons saem apenas para o lado citoplasmático. Portanto, o

processo total catalisado pela citocromo *c* oxidase consiste em:

$$4\ \text{Cit}\ c_{red} + 8\ H^+_{matriz} + O_2 \rightarrow 4\ \text{Cit}\ c_{ox} + 2\ H_2O + 4\ H^+_{citoplasma}$$

A Figura 18.17 resume o fluxo de elétrons a partir de NADH e $FADH_2$ através da cadeia respiratória. Essa série de reações exergônicas está acoplada ao bombeamento de prótons a partir da matriz. Como será mostrado adiante, a energia inerente no gradiente de prótons será empregada na síntese de ATP.

Derivados tóxicos do oxigênio molecular, tais como radical superóxido, são retirados por enzimas protetoras

Como já foi discutido, o oxigênio molecular é um aceptor terminal de elétrons ideal porque sua elevada afinidade por elétrons propicia uma grande força motriz termodinâmica. Todavia, há riscos associados a redução do O_2. A transferência de quatro elétrons resulta em produtos seguros (duas moléculas de H_2O); contudo, a redução parcial gera compostos perigosos. Em especial, *a transferência de um único elétron para O_2 forma ânion superóxido, enquanto a transferência de dois elétrons resulta em peróxido.*

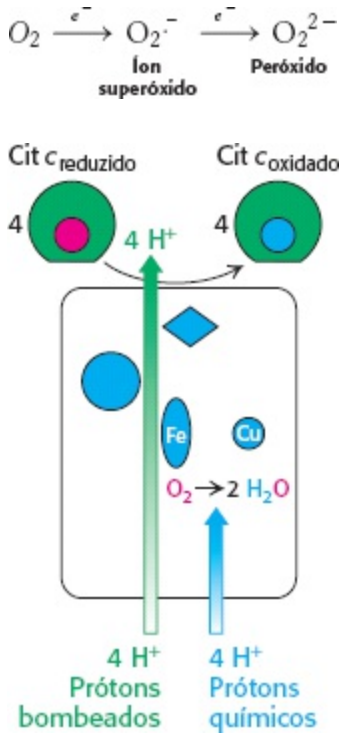


Figura 18.16 Transporte de prótons pela citocromo c oxidase. Quatro prótons são importados do lado da matriz para reduzir uma molécula de O_2 a duas moléculas de H_2O. Esses prótons são chamados de "prótons químicos" porque eles participam de uma reação claramente definida com o O_2. Quatro prótons adicionais bombeados são transportados para fora da matriz e liberados no lado citoplasmático no curso da reação. Os prótons bombeados dobram a eficiência do armazenamento da energia livre na forma de um gradiente de prótons para essa etapa final na cadeia de transporte de elétrons.

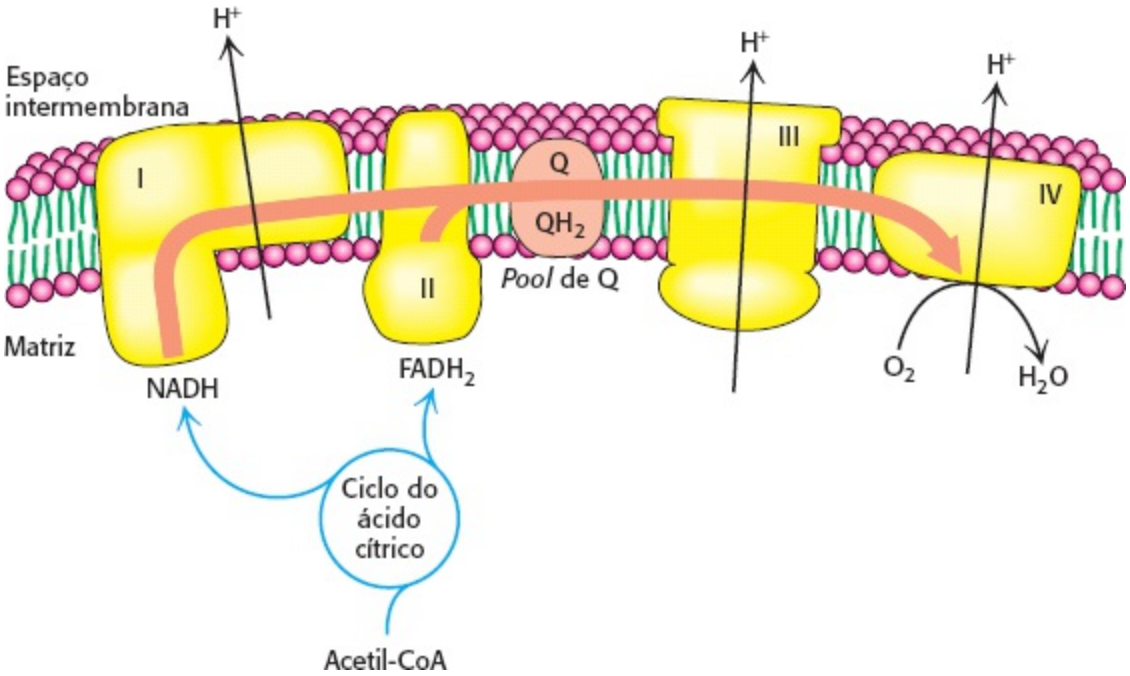


Figura 18.17 Cadeia de transporte de elétrons. Elétrons de alta energia, na forma de NADH e $FADH_2$, são gerados pelo ciclo do ácido cítrico. Esses elétrons fluem através da cadeia respiratória, que impulsiona o bombeamento de prótons e resulta na redução de O_2.

Os dois compostos são potencialmente destrutivos. A estratégia para a redução segura de O_2 é evidente: *o catalisador não libera intermediários parcialmente reduzidos*. A citocromo *c* oxidase atende a esse critério crucial ao manter rigidamente o O_2 entre os íons Fe e Cu.

Embora a citocromo *c* oxidase e outras proteínas que reduzem O_2 sejam extremamente bem-sucedidas na retenção de intermediários, é inevitável a formação de pequenas quantidades de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Superóxido, peróxido de hidrogênio e espécies que podem ser geradas a partir deles, como OH, são coletivamente denominados *espécies reativas do oxigênio* (ROS do, inglês *reactive oxygen species*). A lesão oxidativa causada pelas espécies reativas do oxigênio já foi implicada no processo de envelhecimento, assim como em uma lista crescente de enfermidades (Tabela 18.3).

Quais são as estratégias de defesa celular contra a lesão oxidativa provocada pelas espécies reativas do oxigênio? A principal estratégia de defesa é a enzima *superóxido dismutase*. Essa enzima retira os radicais superóxido por meio de catálise da conversão de dois desses radicais em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular.

$$O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightleftharpoons{\text{Superóxido dismutase}} O_2 + H_2O_2$$

Dismutação

Uma reação em que um reagente é convertido em dois produtos diferentes

Os eucariotos têm duas formas dessa enzima, uma versão contendo manganês localizada nas mitocôndrias e uma forma citoplasmática dependente de cobre e zinco. Essas enzimas realizam a reação de dismutação por um mecanismo semelhante (Figura 18.18). A forma oxidada da enzima é reduzida por superóxido para formar oxigênio. A forma reduzida da enzima, formada nessa reação,

reage com um segundo íon superóxido e forma peróxido, que capta dois prótons ao longo da reação para produzir peróxido de hidrogênio.

Tabela 18.3 Condições patológicas e outras condições que podem estar associadas à lesão por radicais livres.

Aterogênese
Enfisema, bronquite
Doença de Parkinson
Distrofia muscular de Duchenne
Câncer do colo do útero
Hepatopatia alcoólica
Diabetes melito
Insuficiência renal aguda
Síndrome de Down
Fibroplasia retrolenticular (conversão da retina em massa fibrosa em prematuros)
Transtornos vasculares cerebrais
Isquemia, lesão por reperfusão

Fonte: D. B. Marks, A. D. Marks, and C. M. *Smith, Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach* (Williams & Wilkins, 1996), p. 331.

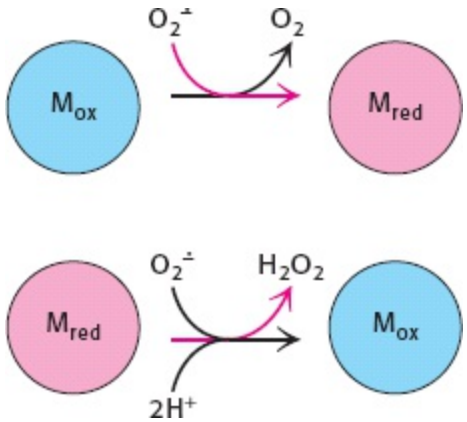


Figura 18.18 Mecanismo da superóxido dismutase. A forma oxidada da superóxido dismutase (M_{ox}) reage com um íon superóxido para formar O_2 e gerar a forma reduzida da enzima (M_{red}). A seguir, a forma reduzida reage com um segundo superóxido e dois prótons para formar peróxido de hidrogênio e regenerar a forma oxidada da enzima.

O peróxido de hidrogênio formado pela superóxido dismutase e por outros processos é retirado pela *catalase*, uma proteína heme ubíqua que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular.

$$2\,H_2O_2 \xrightleftharpoons{\text{Catalase}} O_2 + 2\,H_2O$$

A superóxido dismutase e a catalase são extraordinariamente eficientes, realizando suas reações na taxa limitada por difusão ou próximo a ela (Seção 8.4). A glutationa peroxidase também participa na retirada de H_2O_2 (Seção 20.5). Outras defesas celulares contra a lesão oxidativa incluem as vitaminas antioxidantes, vitaminas E e C. Como a vitamina E é lipofílica, ela é especialmente valiosa na proteção de membranas contra a peroxidação de lipídios.

Um benefício a longo prazo dos exercícios físicos é o aumento da concentração de superóxido dismutase nas células. O elevado metabolismo aeróbico durante a prática de exercícios físicos provoca a geração de mais espécies reativas do oxigênio. Em resposta a isso, a célula sintetiza mais enzimas protetoras. O efeito efetivo é de proteção porque o aumento da concentração de superóxido dismutase protege mais efetivamente a célula durante os períodos de repouso.

Apesar do fato de que as espécies reativas de oxigênio são perigos conhecidos, as evidências recentes sugerem que, em determinadas circunstâncias, a geração controlada dessas substâncias é importante nas vias de transdução de sinais. Por exemplo, os fatores de crescimento comprovadamente aumentam os níveis das ROS como parte de sua via de sinalização e ROS regulam canais e fatores de transcrição. Os papéis duplos das ROS constituem um excelente exemplo da imensa complexidade da bioquímica dos sistemas vivos: até mesmo substâncias potencialmente deletérias podem desempenhar funções úteis.

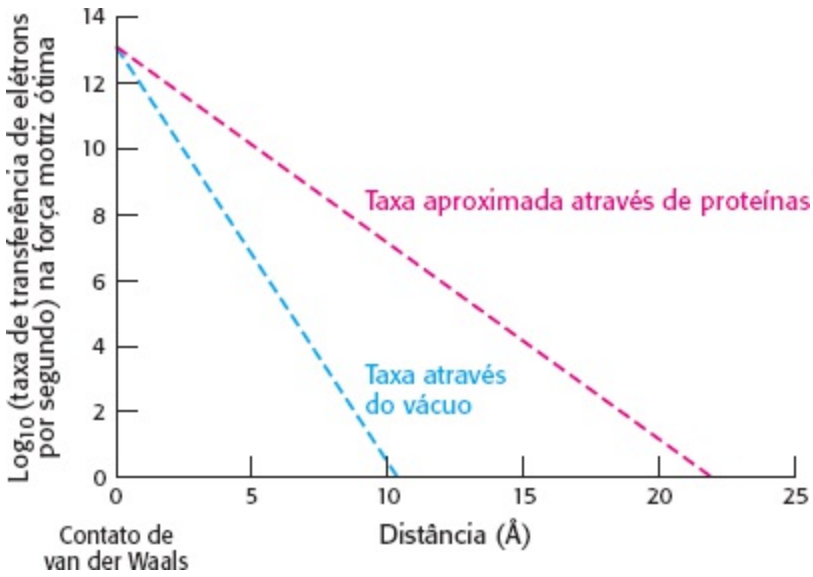


Figura 18.19 Dependência da distância da taxa de transferência de elétrons. A taxa de transferência de elétrons diminui à medida que o doador de elétrons e o aceptor de elétrons se afastam um do outro. No vácuo, a taxa diminui em um fator de 10 para cada aumento de 0,8 Å. Nas proteínas a taxa diminui mais gradativamente, ou seja, um fator de 10 a cada aumento de 1,7 Å. Esse valor é apenas aproximado porque variações na estrutura do meio proteico de permeio podem influenciar a taxa de transferência de elétrons.

Elétrons podem ser transportados entre grupos que não estão em contato

Como os elétrons são transferidos entre grupos carreadores de elétrons da cadeia respiratória? Essa questão é intrigante porque esses grupos estão frequentemente no interior de uma proteína em posições fixas e não estão, portanto, em contato direto um com o outro. Os elétrons conseguem se mover através do espaço, mesmo através do vácuo. Todavia, a taxa de transferência de elétrons através do espaço cai rapidamente à medida que o doador de elétrons e o aceptor de elétrons se

afastam um do outro, reduzindo por um fator de 10 para cada aumento de separação de 0,8 Å. O ambiente proteico proporciona vias mais eficientes para a condução dos elétrons: tipicamente, a taxa de transferência de elétrons diminui em um fator de 10 a cada 1,7 Å (Figura 18.19). No caso de grupos em contato, as reações de transferência de elétrons podem ser muito rápidas, com taxas de aproximadamente 10^{13} s^{-1}. Nas proteínas da cadeia de transporte de elétrons, os grupos carreadores de elétrons são tipicamente separados por 15 Å além de sua distância de contato de van der Waals. No caso dessas separações, são esperadas taxas de transferência de elétrons de aproximadamente 10^4 s^{-1} (ou seja, transferência de elétrons em menos de 1 ms), partindo do pressuposto de que todos os outros fatores são ótimos. Sem a mediação da proteína, uma transferência de elétrons por essa distância demoraria aproximadamente um dia.

O caso é mais complicado quando elétrons precisam ser transferidos entre duas proteínas distintas, como quando o citocromo c aceita elétrons do complexo III ou os transfere para o complexo IV. Várias interações hidrofóbicas aproximam os grupos dos citocromos *c* e c_1 (cerca de 4,5 Å um do outro), com os átomos de ferro separados por 17,4 Å. Essa distância poderia permitir uma redução do citocromo *c* em uma taxa de $8{,}3 \times 10^6$ s^{-1}.

A conformação do citocromo *c* permanece essencialmente constante há mais de 1 bilhão de anos

O citocromo *c* é encontrado em todos os organismos que possuem cadeias respiratórias mitocondriais: plantas, animais e microrganismos eucarióticos. Esse carreador de elétrons evoluiu há mais de 1,5 bilhão de anos, antes da divergência de plantas e animais. Sua função foi conservada ao longo de todo esse tempo, como é evidenciado pelo fato de que, *até o presente momento, o citocromo c de qualquer espécie eucariótica reage in vitro com a citocromo c oxidase de qualquer outra espécie.* Por exemplo, o citocromo *c* do germe de trigo reage com a citocromo *c* oxidase de seres humanos. Além disso, alguns citocromos de procariotos, como o citocromo c_2 da bactéria fotossintética *Rhodospirillum rubrum* e o citocromo c_{550} da bactéria desnitrificante *Paracoccus denitrificans*, são muito semelhantes ao citocromo *c* das mitocôndrias de coração de atum (Figura 18.41). Essas evidências comprovam uma solução evolutiva eficiente para a transferência de elétrons baseada nas características estruturais e funcionais do citocromo *c*.

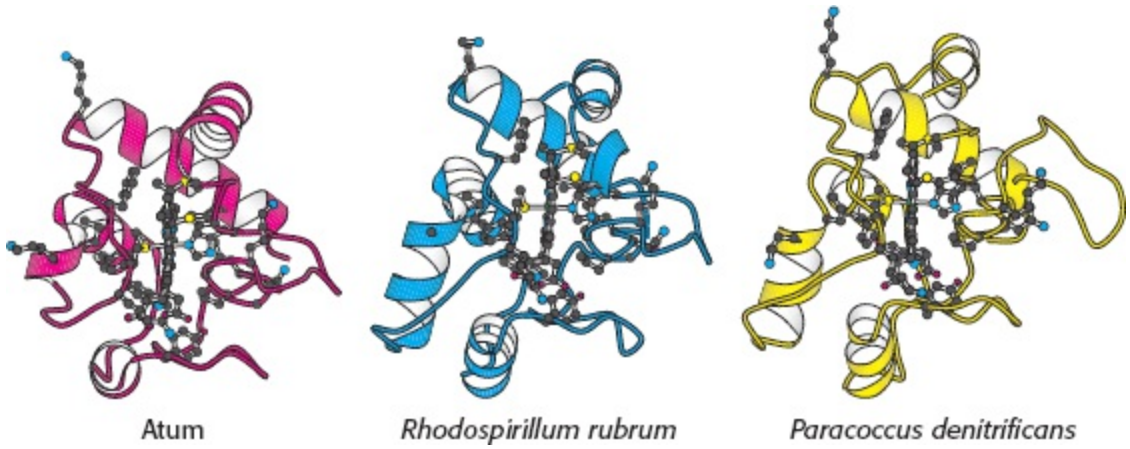


Figura 18.20 Conservação da estrutura tridimensional do citocromo c. As cadeias laterais mostram os 21 aminoácidos conservados e o heme. [Desenhada a partir de 3CYT.pdb, 3C2C.pdb, e 1SSC.pdb.]

A semelhança entre as moléculas do citocromo *c* estende-se ao nível da sequência de aminoácidos.

Tendo em vista o pequeno tamanho e a ubiquidade da molécula, as sequências de aminoácidos do citocromo c de mais de 80 espécies eucarióticas muito diferentes foram determinadas por meio de sequenciamento proteico direto por Emil Smith, Emanuel Margoliash e outros. O achado notável é que *21 dos 104 resíduos não variaram durante mais de 1,5 bilhão de anos de evolução*. Uma árvore filogenética, elaborada a partir das sequências de aminoácidos do citocromo c, revela as relações evolucionárias entre muitas espécies animais (Figura 18.21).

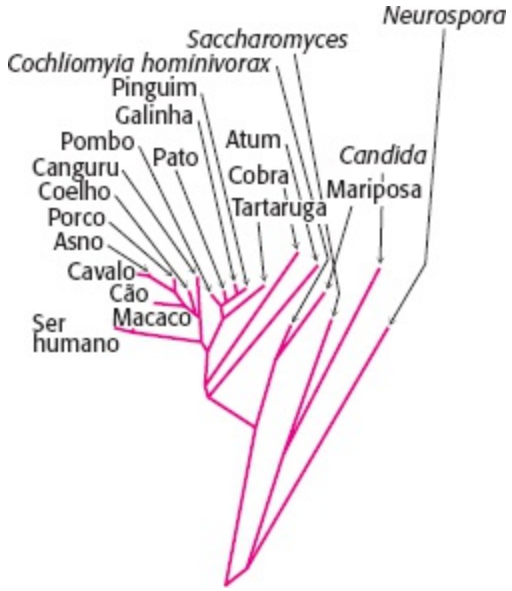


Figura 18.21 Árvore evolutiva criada a partir de sequências do citocromo *c*. O comprimento dos ramos é proporcional ao número de alterações dos aminoácidos que se acredita ter ocorrido. Este desenho é uma adaptação do trabalho de Walter M. Fitch e Emanuel Margoliash.

18.4 Um gradiente de prótons impulsiona a síntese de ATP

Até agora consideramos o fluxo de elétrons de NADH para O_2, um processo exergônico.

$$NADH + \tfrac{1}{2}\, O_2 + H^+ \rightleftharpoons H_2O + NAD^+$$

$$\Delta G^{o\prime} = -220{,}1 \text{ kJ mol}^{-1} \ (-52 \text{ kcal mol}^{-1})$$

A seguir, consideraremos como esse processo é acoplado à síntese de ATP, um processo endergônico.

$$ADP + P_i + H^+ \rightleftharpoons ATP + H_2O$$

$$\Delta G^{o\prime} = +30{,}5 \text{ kJ mol}^{-1} \ (+7{,}3 \text{ kcal mol}^{-1})$$

Um complexo enzimático na membrana mitocondrial interna realiza a síntese de ATP. Esse complexo de enzimas foi chamado originalmente de *ATPase mitocondrial* ou *F_1 F_0 ATPase* porque foi descoberto através de sua catálise da reação reversa, a hidrólise de ATP. A denominação *ATP sintase*, a denominação preferida, enfatiza seu papel real na mitocôndria. Também é chamada de *complexo V*.

Como a oxidação de NADH é acoplada a fosforilação de ATP? Primeiro, foi sugerido que a transferência de elétrons resulta na formação de um intermediário covalente rico em energia que atua como um composto de alta transferência de fosforila, análoga a geração de ATP pela formação de

1,3-bisfosfoglicerato na glicólise (Seção 16.1). Uma proposta alternativa era que a transferência de elétrons auxilia na formação de uma conformação ativa da proteína, que impulsiona então a síntese de ATP. A busca durante décadas desses intermediários foi infrutífera.

Em 1961, Peter Mitchell sugeriu um mecanismo radicalmente diferente, *a hipótese químio-osmótica*. Ele propôs que o transporte de elétrons e a síntese de ATP estavam acoplados por *um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna*. No modelo de Peter Mitchell, a transferência de elétrons através da cadeia respiratória resulta no bombeamento de prótons da matriz para o lado citoplasmático da membrana mitocondrial interna. A concentração de H^+ torna-se mais baixa na matriz e é gerado um campo elétrico com o lado da matriz negativo (Figura 18.22). A seguir, os prótons fluem de volta para a matriz para igualar a distribuição. A ideia de Mitchell era que esse fluxo de prótons impulsiona a síntese de ATP pela ATP sintase. A distribuição desigual de prótons (rica em energia) é denominada *força próton-motriz*. A força próton-motriz pode ser imaginada como tendo dois componentes: um gradiente químico e um gradiente elétrico. O gradiente químico para os prótons pode ser representado como um gradiente de pH. O gradiente elétrico é criado pela carga elétrica positiva nos prótons distribuídos de forma desigual que formam o gradiente químico. Mitchell propôs que os dois componentes impulsionam a síntese de ATP.

Força próton-motriz (Δp) =

gradiente químico (ΔpH) + gradiente elétrico ($\Delta\psi$)

A hipótese extremamente inovadora de Mitchell de que a oxidação e a fosforilação estão acopladas por um gradiente de prótons é apoiada atualmente por inúmeras evidências. Na verdade, o transporte de elétrons gera um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna. O pH externo é 1,4 unidade menor que o interno e o potencial de membrana é 0,14 V, com o exterior sendo positivo. Como é calculado na página 535, esse potencial de membrana corresponde a uma energia livre de 21,8 kJ (5,2 kcal) por mol de prótons.

Alguns especialistas argumentam que, juntamente com a elucidação da estrutura do DNA, a descoberta de que a síntese de ATP é impulsionada por um gradiente de prótons é um dos dois principais avanços na biologia no século 20. A teoria químioosmótica inicial proposta por Mitchell não foi bem recebida por todos. Efraim Racker, um dos primeiros pesquisadores da ATP sintase, lembra que alguns colegas não levaram a sério o trabalho de Mitchell. Peter Mitchell recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1978 por contribuições para a compreensão da fosforilação oxidativa.

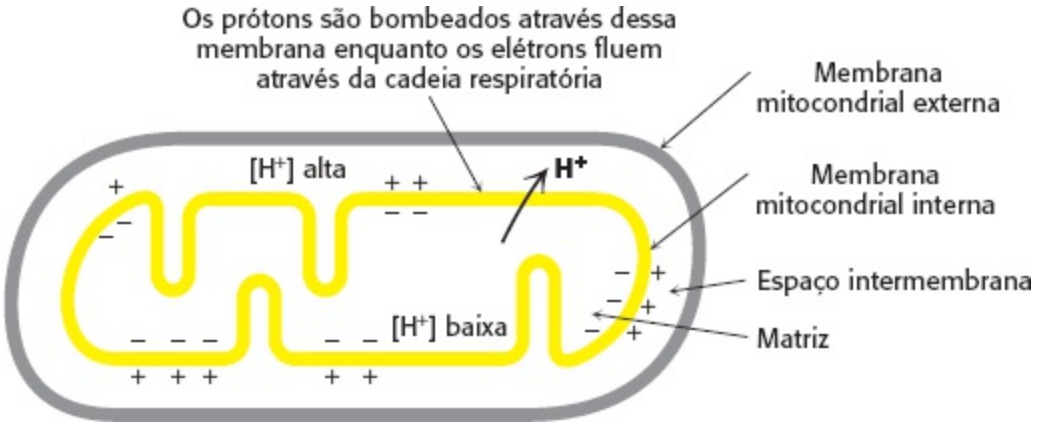


Figura 18.22 Hipótese químio-osmótica. A transferência de elétrons através da cadeia respiratória resulta no bombeamento de prótons da matriz para o lado citoplasmático da membrana mitocondrial interna. O gradiente de pH e o potencial de membrana constituem uma força próton-motriz que é usada para impulsionar a síntese de ATP.

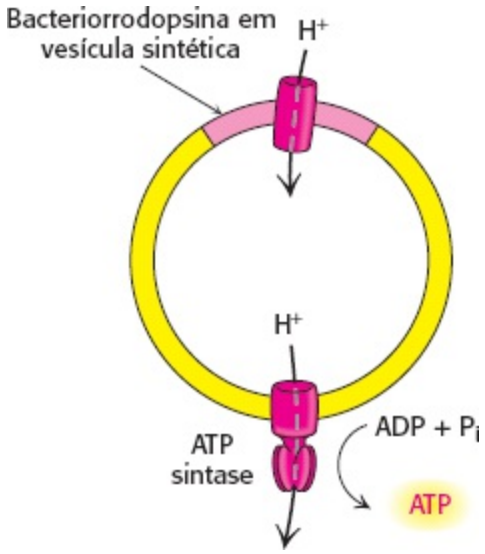


Figura 18.23 Teste da hipótese químioosmótica. O ATP é sintetizado quando as vesículas de membrana reconstituídas contendo bacteriorrodopsina (uma bomba de prótons impulsionada por luz) e a ATP sintase são iluminadas. A orientação da ATP sintase nessa membrana reconstituída é o reverso do que ocorre na mitocôndria.

Um sistema artificial foi criado para demonstrar o princípio básico da hipótese químio-osmótica. O papel da cadeia respiratória foi desempenhado pela bacteriorrodopsina, uma proteína de membrana de halobactérias que bombeia proteínas quando é iluminada. Foram criadas vesículas sintéticas contendo bacteriorrodopsina e ATP sintase mitocondrial purificada de coração de boi (Figura 18.23). Quando as vesículas foram expostas à luz, foi formado ATP. Esse experimento importante mostrou com clareza que a *cadeia respiratória e a ATP sintase são sistemas bioquimicamente separados, ligados apenas por uma força próton-motriz.*

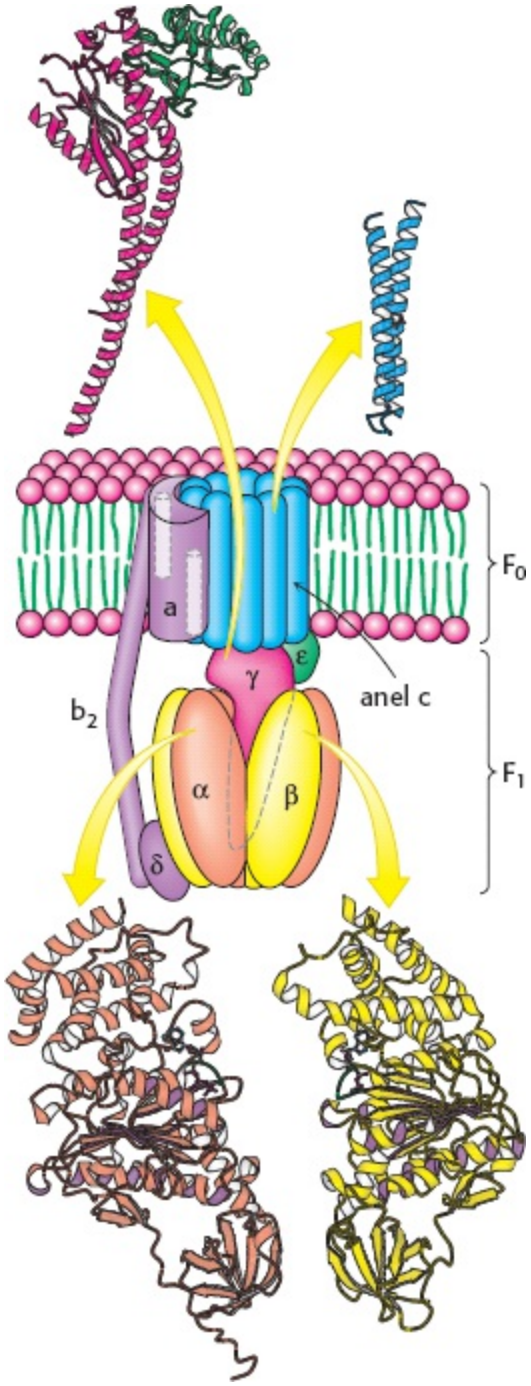


Figura 18.24 Estrutura da ATP sintase. Uma estrutura esquemática é mostrada ao longo das representações dos componentes para as quais as estruturas foram determinadas com alta resolução. Os domínios NTPase de alça P das subunidades α e β estão indicadas pela cor roxa. *Observe* que parte do complexo enzimático está embebida na membrana mitocondrial interna, enquanto o restante se localiza na matriz. [Desenhada a partir de 1E79.pdb e 1COV.pdb.]

A ATP sintase é constituída por uma unidade condutora de prótons e uma unidade catalítica

Duas pelas do enigma de como o NADH está acoplado à síntese de ATP são conhecidos agora: (1) o transporte de elétrons gera uma força prótonmotriz; (2) a síntese de ATP pela ATP sintase pode ser impulsionada pela força próton-motriz. Como a força próton-motriz é convertida no alto potencial de transferência de fosforila do ATP?

Estudos bioquímicos, de microscopia eletrônica e de cristalografia da ATP sintase revelaram muitos detalhes de sua estrutura (Figura 18.24). Trata-se de uma enzima grande e complexa que se assemelha a uma bola em um palito. Grande parte do "palito", a chamada subunidade F_0, está

embebida na membrana mitocondrial interna. A "bola" tem um diâmetro de 85 Å, denominada subunidade F_1, projeta-se em direção a matriz mitocondrial. A subunidade F_1 contém a atividade catalítica da sintase. Na verdade, subunidades F_1 isoladas apresentam atividade ATPase.

A subunidade F_1 consiste em cinco tipos de cadeias polipeptídicas (α_3, β_3, γ, δ e ε) com a estequiometria indicada. As subunidades α e β, que constituem a maior parte da subunidade F_1, estão dispostas alternativamente em um anel hexamérico; elas são homólogas uma a outra e são membros da família NTPase de alça P (Seção 9.4). Ambas se ligam a nucleotídios, mas apenas as subunidades β participam diretamente na catálise. Logo abaixo das subunidades α e β se inicia uma haste central constituída pelas proteínas γ e ε. A subunidade γ inclui uma estrutura espiralada helicoidal longa que se estende para o centro do hexâmetro $\alpha_3\beta_3$. *A subunidade γ rompe a simetria do hexâmetro $\alpha_3\beta_3$: cada uma das subunidades β é distinta em virtude de sua interação com uma superfície diferente de γ.* A diferenciação das três subunidades β é crucial para a compreensão do mecanismo de síntese de ATP.

A subunidade F_0 é um segmento hidrofóbico que atravessa a membrana mitocondrial interna. *F_0 contém o canal de prótons do complexo.* Esse canal consiste em um anel com 10 a 14 subunidades **c** que estão embebidas na membrana. Uma única subunidade **a** se liga a parte externa do anel. As subunidades F_0 e F_1 estão conectadas de duas maneiras: por uma haste $\gamma\varepsilon$ central e por uma coluna exterior. A coluna exterior consiste em uma subunidade **a**, duas subunidades **b** e a subunidade δ.

O fluxo de prótons através da ATP sintase resulta na liberação do ATP fortemente ligado: o mecanismo de modificação da ligação

A ATP sintase catalisa a formação de ATP a partir de ADP e ortofosfato.

$$ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+ \rightleftharpoons ATP^{4-} + H_2O$$

Os substratos verdadeiros são ADP e ATP complexada ao Mg^{2+}, como em todas as reações conhecidas de transferência de fosforila com esses nucleotídios. Um átomo de oxigênio terminal do ADP ataca o átomo de fósforo de P_i para formar um intermediário pentacovalente, que depois se dissocia em ATP e H_2O (Figura 18.25).

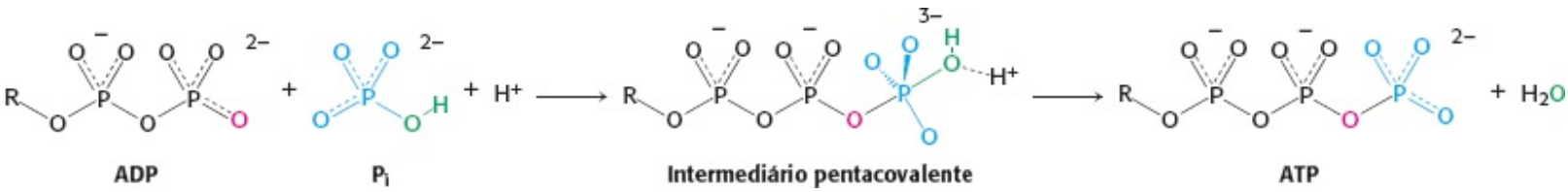


Figura 18.25 Mecanismo de síntese de ATP. Um dos átomos de oxigênio do ADP ataca o átomo de fosfóro do Pi para formar um intermediário pentacovalente, que depois forma ATP e libera uma molécula de H_2O.

Como o fluxo de prótons impulsiona a síntese de ATP? Experimentos de troca de isótopos revelaram, de modo inesperado, que *o ATP ligado à enzima se forma prontamente na ausência de uma força próton-motriz*. Quando ADP e P_i foram adicionados a ATP sintase na $H_2{}^{18}O$, ^{18}O foi incorporado ao P_i por meio da síntese de ATP e sua subsequente hidrólise (Figura 18.26). A taxa de incorporação de ^{18}O ao P_i mostrou que quantidades aproximadamente iguais de ATP e ADP estão em equilíbrio no sítio catalítico, mesmo na ausência de um gradiente de prótons. Todavia, ATP não sai do sítio catalítico a menos que haja fluxo de prótons através da enzima. Assim, *a função do*

gradiente de prótons não é formar ATP, mas liberá-lo da sintase.

O fato de que três subunidades β são componentes da subunidade F_1 da ATPase significa que existem três sítios ativos na enzima, cada um deles desempenhando uma de três funções em cada momento. A força prótonmotriz faz com que os três sítios ativos modifiquem sequencialmente funções enquanto os prótons fluem através do componente da enzima embebido na membrana. Na verdade, podemos imaginar a enzima como tendo uma parte móvel e uma parte estática: (1) a unidade móvel, ou *rotor*, consiste no anel **c** e na haste γε e (2) a unidade estática, *estator*, consiste no restante da molécula.

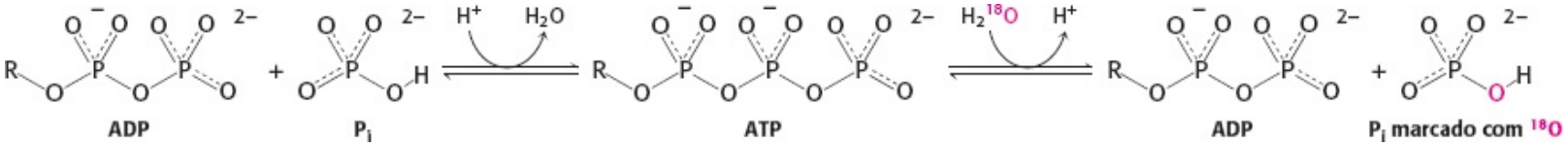


Figura 18.26 ATP forma-se sem uma força próton-motriz, mas não é liberado. Os resultados de experimentos com troca de isótopos indicam que o ATP ligado a enzima é formado a partir de ADP e P_i na ausência de uma força próton-motriz.

Como os três sítios ativos da ATP sintase respondem ao fluxo de prótons? Várias observações experimentais sugeriram um *mecanismo de troca de ligação* para a síntese de ATP impulsionada por prótons. Essa proposta diz que uma subunidade β consegue realizar cada uma de três etapas sequenciais na síntese de ATP mudando a sua conformação. Essas etapas são: (1) ligação de ADP e P_i, (2) síntese de ATP e (3) liberação de ATP. Como já foi mencionado, as interações com a subunidade γ tornam as três subunidades β não equivalentes (Figura 18.27). Em qualquer dado momento, uma subunidade β estará na conformação L (*loose*, flexível). Essa conformação se liga a ADP e P_i. Uma segunda subunidade estará na conformação T (*tight*, rígida). Essa conformação se liga ao ATP com grande avidez, de modo que converte ADP e P_i ligados em ATP. Tanto a conformação T como a conformação L são limitadas de modo a não conseguirem liberar os nucleotídios ligados. A subunidade final estará na forma O (*open*, aberta). Essa forma apresenta uma conformação mais aberta e consegue ligar ou liberar nucleotídios de adenina.

A rotação da subunidade γ impulsiona a interconversão dessas três formas (Figura 18.28). ADP e P_i ligados na subunidade na forma T se combinam transitoriamente para formar ATP. Suponhamos que a subunidade roda 120° no sentido anti-horário (visão de cima). Essa rotação converte o sítio na forma T em um sítio na forma O com o nucleotídio ligado como ATP. Ao mesmo tempo, o sítio na forma L é convertido em um sítio na forma T, possibilitando a transformação de ADP e P_i adicional em ATP. O ATP no sítio na forma O consegue, nesse momento, separar-se da enzima para ser substituído por ADP e P_i. Outra rotação de 120° converte esse sítio na forma O em um sítio na forma L, aprisionando esses substratos. Cada subunidade evolui da forma T para a forma O e desta para a forma L e não há duas subunidades que se encontram na mesma forma conformacional. Esse mecanismo sugere que ATP pode ser sintetizado e liberado ao impulsionar a rotação da subunidade γ na direção apropriada.

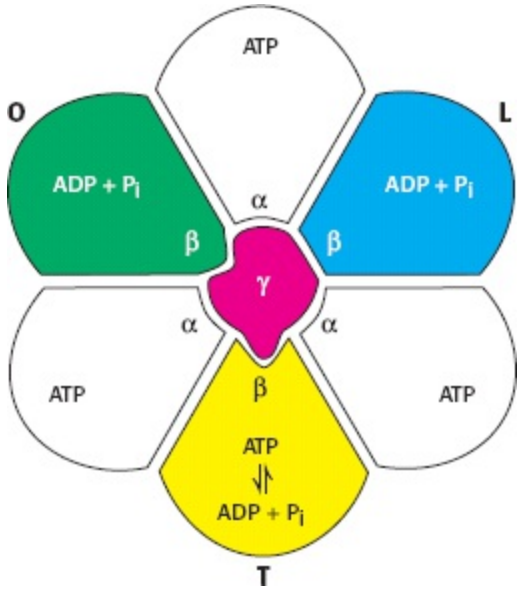


Figura 18.27 Os sítios de ligação de nucleotídio da ATP sintase não são equivalentes. A subunidade γ passa através do centro do hexâmeto $\alpha_3\beta_3$ e forma os sítios de ligação de nucleotídios nas subunidades β. Esses sítios de ligação são distintos entre si. *Observe* que cada subunidade α contém ATP ligado, mas esses nucleotídios não participam nas reações. As subunidades β estão coloridas para permitir a diferenciação das mesmas. O = conformação aberta; L = conformação flexível; T = conformação rígida.

Alteração progressiva das formas dos três sítios ativos da ATP sintase

Subunidade 1 L → T → O → L → T → O....

Subunidade 2 O → L → T → O → L → T....

Subunidade 3 T → O → L → T → O → L....

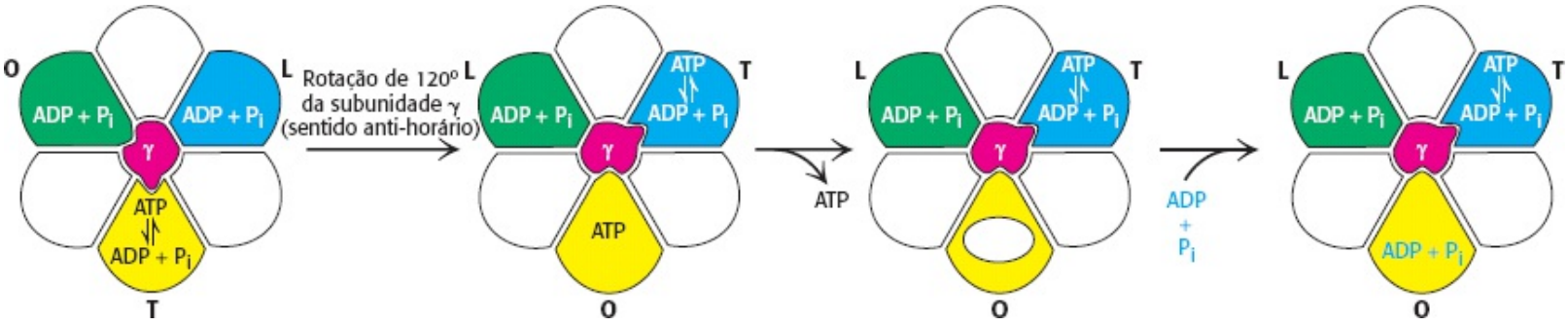


Figura 18.28 Mecanismo de mudança de ligação na ATP sintase. A rotação da subunidade γ faz a interconversão das três subunidades β. A subunidade na forma T (*tight*, rígida) faz a interconversão entre ADP e P_i e ATP, mas não permite a liberação do ATP. Quando a subunidade γ é rodada 120° no sentido anti-horário, a subunidade na forma T é convertida à forma O (*open*, aberta), possibilitando a liberação de ATP. ADP e P_i conseguem, então, conectar-se à subunidade na forma O. Uma rotação adicional de 120° (não mostrada) conserva esses substratos em uma subunidade na forma L (*loose*, flexível).

A catálise rotacional é o menor motor molecular do mundo

É possível observar diretamente a rotação proposta? Experimentos bem elaborados, utilizando técnicas monomoleculares (Seção 8.6), demonstraram a rotação por meio de um sistema experimental simples e constituído apenas por subunidades $\alpha_3\beta_3\gamma$ (Figura 18.29). As subunidades β foram manipuladas de modo a conter marcadores no aminoterminal de poli-histidina, que apresenta elevada afinidade por íons de níquel (Seção 3.1). Essa propriedade dos marcadores possibilitou a

imobilização da "montagem" das subunidades $\alpha_3\beta_3\gamma$ em uma superfície de vidro cobertura com íons níquel. A subunidade γ foi conectada a um filamento de actina fluorescente de modo a formar um segmento longo que poderia ser observado sob um microscópio fluorescente. É digno de nota que o acréscimo de ATP provocou a rotação unidirecional do filamento de actina no sentido anti-horário. *Observou-se que a subunidade γ rodava, impulsionada pela hidrólise de ATP*. Assim sendo, a atividade catalítica de uma molécula individual poderia ser observada. A rotação no sentido anti-horário é consistente com o mecanismo previsto de hidrólise porque a molécula foi vista de baixo para cima em comparação com a imagem mostrada na Figura 18.29.

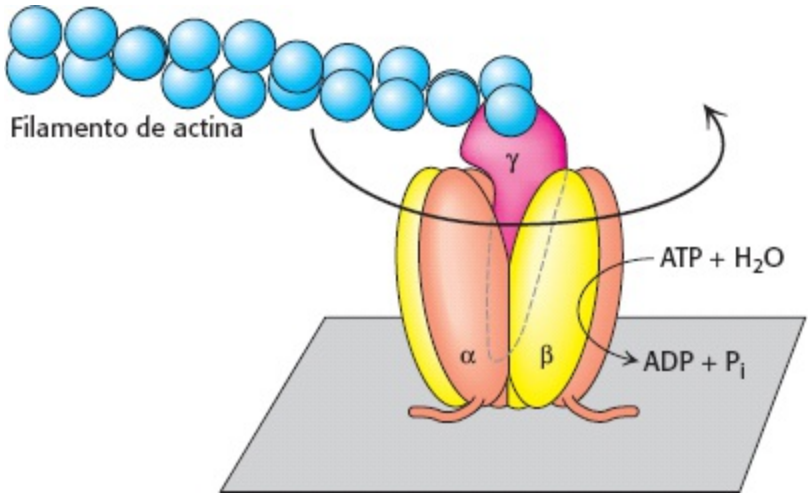


Figura 18.29 Observação direta da rotação da ATP sintase impulsionada por ATP. O hexâmero $\alpha_3\beta_3\gamma$ da ATP sintase é fixada a uma superfície, com a subunidade γ projetando-se para cima e ligada a um filamento de actina fluorescente. O acréscimo e a subsequente hidrólise do ATP resultaram na rotação no sentido anti-horário da subunidade γ, que pode ser vista diretamente em um microscópio de fluorescência.

Uma análise mais detalhada, na presença de concentrações mais baixas de ATP, revelou que a subunidade γ roda em incrementos de 120°. Cada incremento corresponde à hidrólise de uma única molécula de ATP. Além disso, a partir dos resultados obtidos pela variação do comprimento do filamento de actina e pela determinação da taxa de rotação, a enzima parece funcionar com uma eficiência de quase 100%, ou seja, essencialmente toda a energia liberada pela hidrólise do ATP é convertida em movimento rotacional.

O fluxo de prótons em torno do anel c impulsiona a síntese de ATP

A observação direta do movimento rotacional da subunidade γ constitui forte evidência do mecanismo rotacional para a síntese de ATP. A última questão remanescente é: como o fluxo de prótons através de F_0 impulsiona a rotação da subunidade γ? Howard Berg e George Oster propuseram um mecanismo aprimorado que dá uma resposta clara para essa questão. O mecanismo depende das estruturas das subunidades **a** e **c** de F_0 (Figura 18.30). A subunidade **a** estática comprime diretamente o anel transmembranar formado por 10 a 14 subunidades **c**. Embora a estrutura da subunidade **a** ainda não tenha sido demonstrada experimentalmente, várias evidências são condizentes com uma estrutura que inclui dois meios-canais hidrofílicos que não atravessam completamente a membrana (ver Figura 18.30). Dessa maneira, os prótons conseguem penetrar nesses canais, mas não conseguem se mover por toda a membrana. A subunidade **a** está posicionada de tal modo que cada meio-canal interage diretamente com uma subunidade **c**.

A estrutura da subunidade **c** foi determinada por métodos NMR e por cristalografia de raios X. Cada cadeia polipeptídica forma um par de α-hélices α que atravessa a membrana. Um resíduo de ácido aspártico (Asp 61) é encontrado no meio de uma das hélices. O fator crucial para o movimento de prótons através da membrana é que, em um ambiente rico em prótons, como o lado citoplasmático da membrana mitocondrial, um próton entrará em um canal e se ligará ao resíduo de aspartato (Figura 18.31). A subunidade **c** com o próton ligado roda, a seguir, através da membrana até o ácido aspártico ficar em um ambiente pobre em prótons do outro meio-canal, onde o próton é liberado. *O movimento de prótons através dos meios-canais, desde a elevada concentração de prótons do citoplasma até a baixa concentração de prótons da matriz, impulsiona a rotação do anel* ***c***. Sua rotação é favorecida pela capacidade do resíduo de ácido aspártico recém-protonado (neutralizado) de ocupar o ambiente hidrofóbico da membrana. Assim, a subunidade **c** com o aspartato recém-protonado afasta-se do contato com o meio-canal citoplasmático em direção à membrana e as outras subunidades **c** se movem em uníssono. A unidade **a** permanece imóvel enquanto o anel **c** gira. Cada próton que penetra no meio-canal citoplasmático da unidade **a** se move através da membrana graças à "carona" no anel **c** para girar e sair através do meio-canal da matriz para o ambiente pobre em prótons da matriz (Figura 18.32).

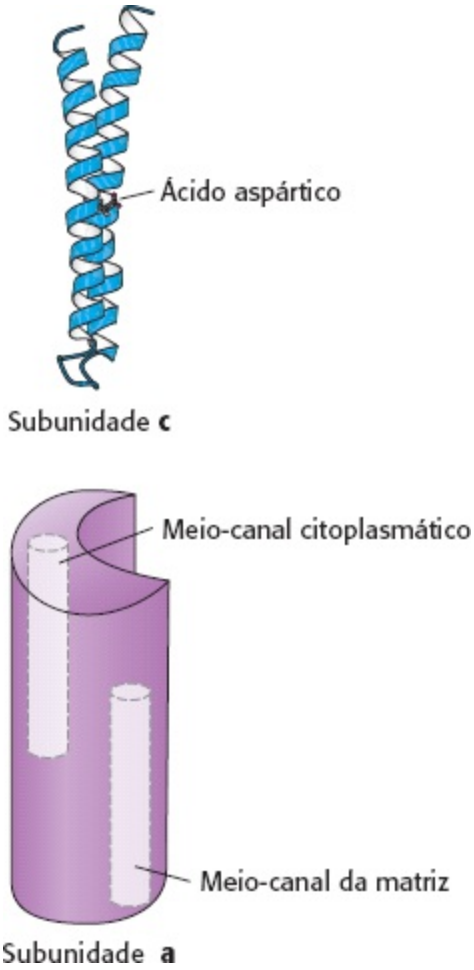


Figura 18.30 Componentes da unidade condutora de prótons da ATP sintase. A subunidade **c** consiste em duas α-hélices α que atravessam a membrana. Um resíduo ácido de aspartato em uma das hélices está localizado no centro da membrana. A estrutura da subunidade **a** ainda não foi observada diretamente, mas parece incluir dois meios-canais que possibilitam a entrada dos prótons que passam parcialmente mas não atravessam toda a membrana, apenas de modo incompleto.

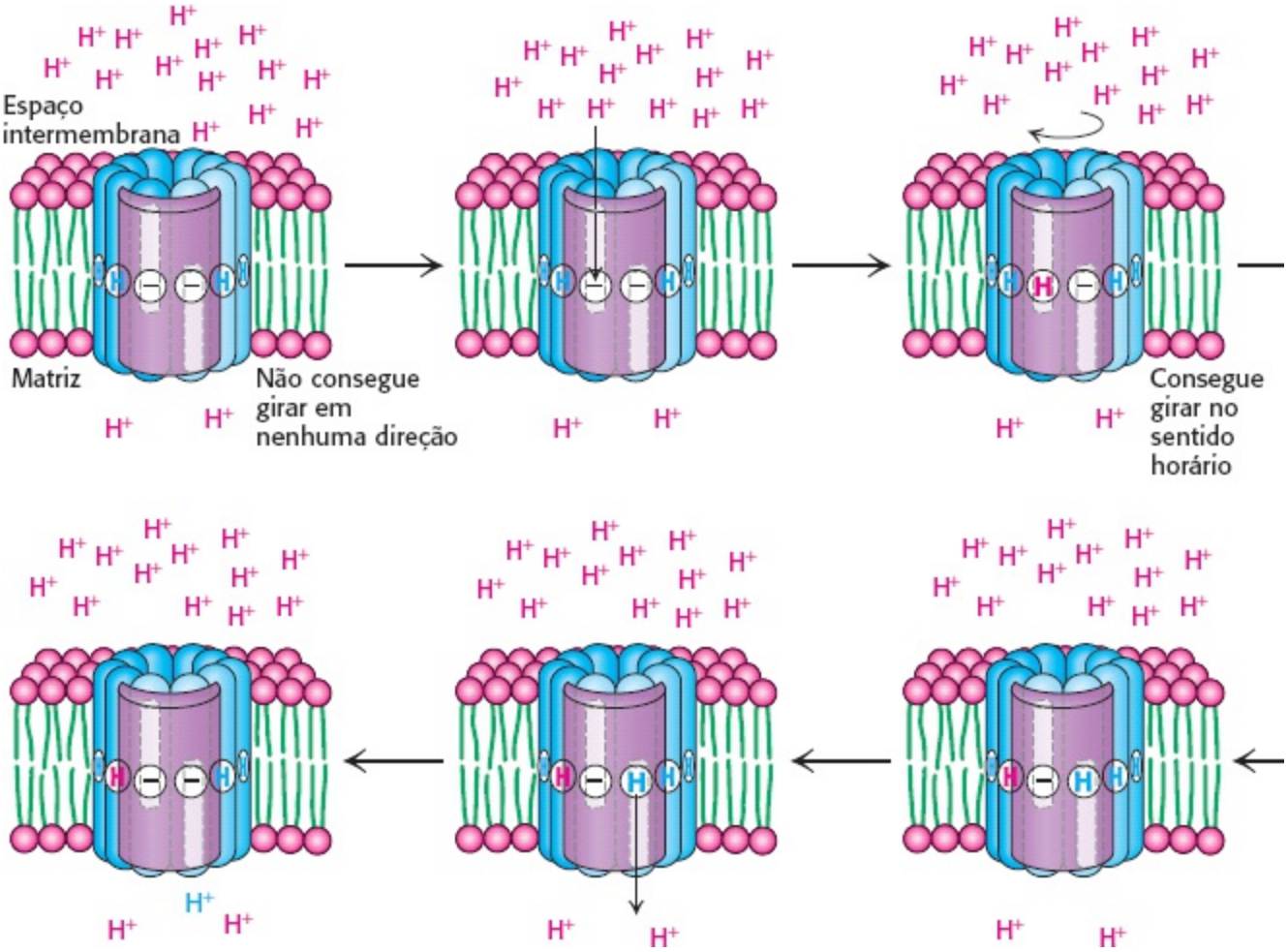


Figura 18.31 O movimento dos prótons através da membrana impulsiona a rotação do anel c. Um próton proveniente do espaço intermembrana penetra no meio-canal citoplasmático para neutralizar a carga elétrica de um resíduo de aspartato em uma subunidade **c**. Quando essa carga elétrica é neutralizada, o anel **c** consegue girar no sentido horário por uma subunidade **c** e move um resíduo de ácido aspártico para fora da membrana para o meio-canal da matriz. Esse próton consegue se mover para a matriz, recolocando o sistema em seu estado inicial.

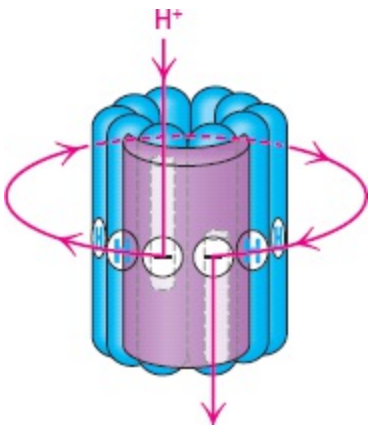


Figura 18.32 Trajeto do próton através da membrana. Cada próton penetra no meio-canal citoplasmático, acompanha uma rotação completa do anel c e sai através do outro meio-canal para a matriz.

Pouca energia que rende muito

Apesar das várias "maquinações" moleculares e dos numerosos ATP sintetizados e prótons bombeados, um ser humano em repouso precisa de pouquíssima energia. Aproximadamente 116 watts, a energia produzida por uma típica lâmpada, é suficiente para sustentar uma pessoa em repouso.

Como a rotação do anel **c** resulta na síntese de ATP? O anel C está rigidamente ligado às

subunidades γ e ε. Portanto, à medida que o anel **c** gira, as subunidades γ e ε são virados no interior do hexâmero $\alpha_3\beta_3$ de F_1. A rotação da subunidade γ promove, por sua vez, a síntese de ATP por meio do mecanismo de troca de ligação. A coluna externa formada pelas cadeias **b** e pela subunidade Δ impede a rotação do hexâmero $\alpha_3\beta_3$. É preciso lembrar que o número de subunidades **c** no anel **c** parece variar entre 10 e 14. Esse número é significativo porque determina o número de prótons que têm de ser transportados para gerar uma molécula de ATP. Cada rotação de 360° da subunidade γ resulta na síntese e na liberação de três moléculas de ATP. Portanto, se houver 10 subunidades **c** no anel (como foi observado em uma estrutura cristalina da ATP sintase mitocondrial de levedura), cada ATP gerado exige o transporte de 10/3 = 3,33 prótons. Para simplificar, partiremos do pressuposto de que três prótons precisam fluir para a matriz para cada ATP formado, mas é preciso lembrar que o valor verdadeiro pode ser diferente. Como veremos adiante, os elétrons provenientes do NADH bombeiam prótons suficientes para gerar 2,5 moléculas de ATP, enquanto aqueles provenientes do $FADH_2$ produzem 1,5 molécula de ATP.

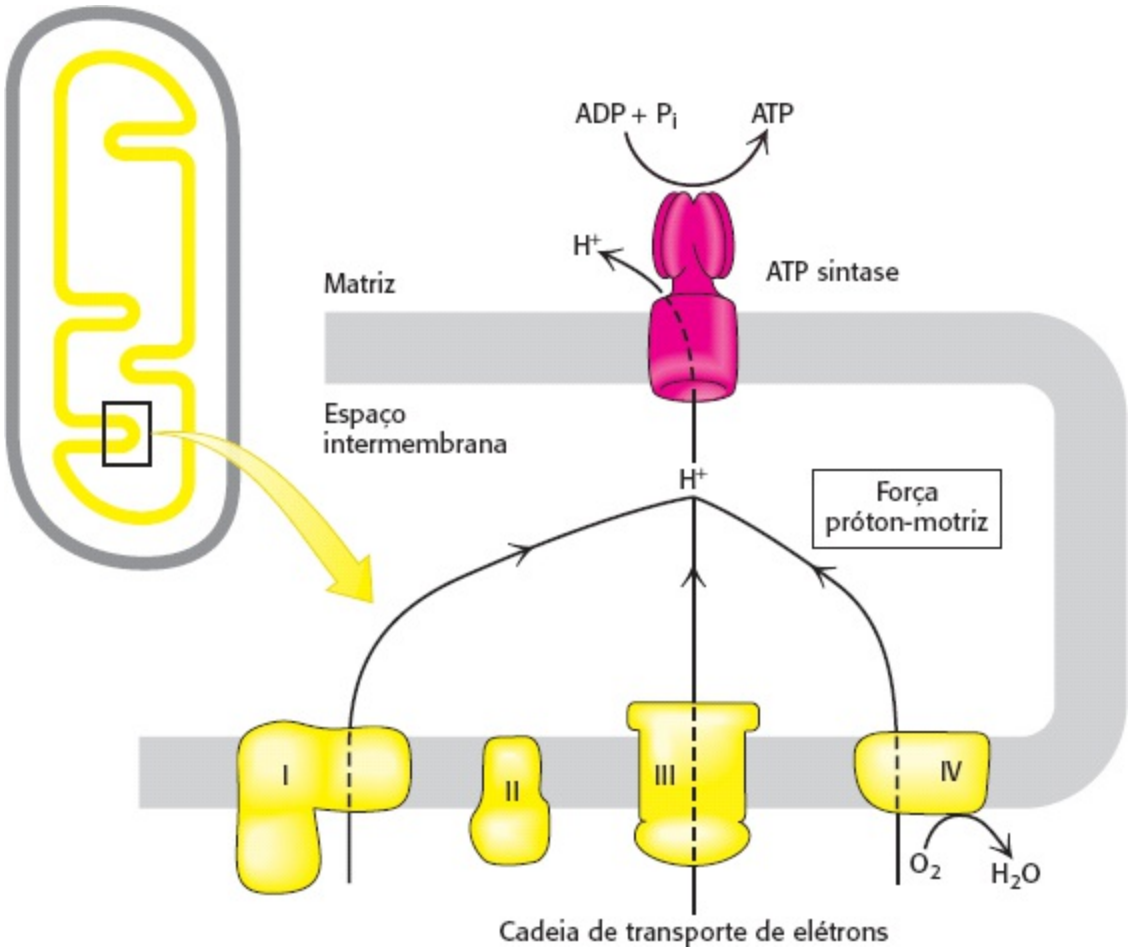


Figura 18.33 Resumo da fosforilação oxidativa. A cadeia de transporte de elétrons gera um gradiente de prótons, que é usado para sintetizar ATP.

Voltemos por um momento ao exemplo com o qual começamos esse capítulo. Se um ser humano em repouso precisa de 85 kg de ATP por dia para as funções corporais, então $3{,}3 \times 10^{25}$ prótons precisam fluir através da ATP sintase por dia, ou $3{,}3 \times 10^{21}$ prótons por segundo. A Figura 18.33 resume o processo da fosforilação oxidativa.

A ATP sintase e as proteínas G compartilham algumas características

As subunidades α e β da ATP sintase são membros da família de proteínas NTPase de alça P. N Capítulo 14 aprendemos as propriedades sinalizadoras de outros membros dessa família, as proteínas G, dependem de sua capacidade de ligar nucleosídios trifosfatos e difosfatos com grande tenacidade. Essas proteínas não trocam nucleotídios a menos que sejam estimuladas a fazê-lo por interação com outras proteínas. O mecanismo de troca de ligação da ATP sintase é uma variação desse tema. As regiões de laço P das subunidades β se ligam a ADP ou ATP (ou liberam ATP), dependendo de com qual das três faces da subunidade γ interagem. As alterações conformacionais ocorrem de modo ordenado, impulsionadas pela rotação da subunidade γ.

18.5 Muitos circuitos ou lançadeiras (*shuttles*) possibilitam o movimento através das membranas mitocondriais

A membrana mitocondrial interna tem de ser impermeável a maioria das moléculas, contudo, muitas trocas precisam ocorrer entre o citoplasma e as mitocôndrias. Essa troca é mediada por várias proteínas transportadoras transmembranares (Seção 13.4).

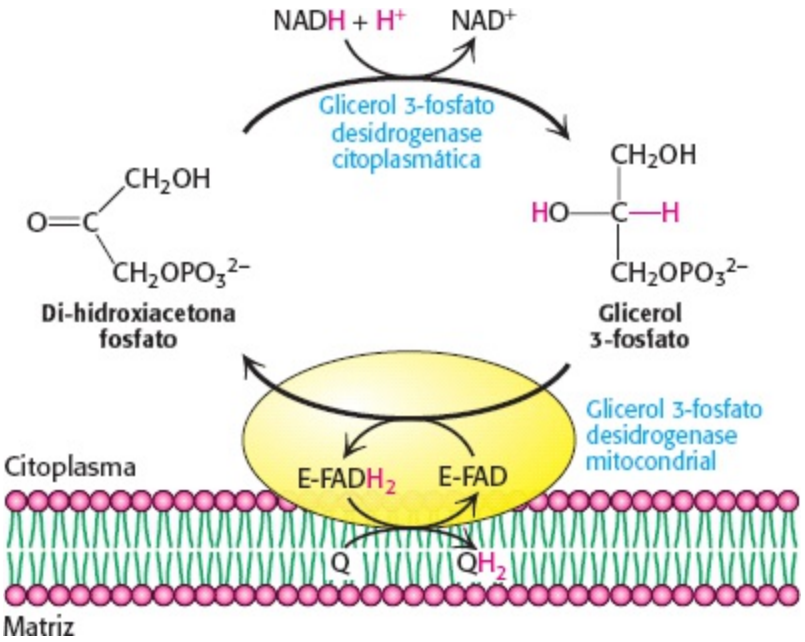


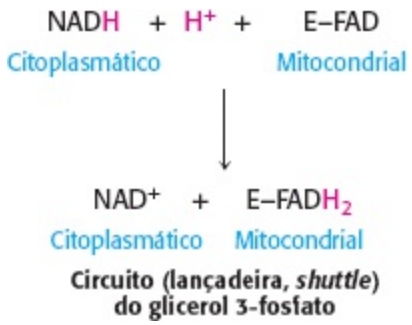
Figura 18.34 Lançadeira ou circuito (*shuttle*) do glicerol 3-fosfato. Elétrons provenientes de NADH conseguem penetrar na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial ao serem utilizados para reduzir di-hidroxiacetona fosfato a glicerol 3-fosfato. O glicerol 3-fosfato é reoxidado por transferência de elétrons para um grupo prostético FAD em uma enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase ligada à membrana. A transferência de elétrons subsequente para Q com o propósito de formar QH_2 possibilita que esses elétrons entrem na cadeia de transporte de elétrons.

Os elétrons provenientes de NADH citoplasmático entram nas mitocôndrias graças a circuitos (lançadeiras, *shuttles*)

Uma das funções da cadeia respiratória é regenerar NAD^+ para uso na glicólise. Como o NADH citoplasmático é reoxidado a NAD^+ em condições aeróbicas? NADH não consegue simplesmente penetrar nas mitocôndrias para oxidação pela cadeia respiratória porque a membrana mitocondrial interna é impermeável a NADH e NAD^+. A solução é que *elétrons provenientes de NADH*, em vez de o próprio NADH, são transportados através da membrana mitocondrial. Um dos vários meios de introduzir elétrons provenientes de NADH na cadeia de transporte de elétrons é o *circuito*

(lançadeira, shuttle) do glicerol 3-fosfato (Figura 18.34). A primeira etapa nesse circuito é a transferência de um par de elétrons de NADH para di-hidroxiacetona fosfato, um intermediário glicolítico, para formar glicerol 3-fosfato. Essa reação é catalisada por uma enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase no citoplasma. O glicerol 3-fosfato é reoxidado a di-hidroxiacetona fosfato na superfície externa da membrana mitocondrial interna por uma isozima ligada a membrana da enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase. Um par de elétrons proveniente do glicerol 3-fosfato é transferido para um grupo prostético FAD nessa enzima para formar $FADH_2$. Essa reação também regenera di-hidroxiacetona fosfato.

A flavina reduzida transfere seus elétrons para o transportador de elétrons Q, que entra na cadeia respiratória na forma de QH_2. *Quando o NADH citoplasmático transportado pelo circuito (lançadeira, shuttle*) *do glicerol 3-fosfato é oxidado pela cadeia respiratória, é formada 1,5 molécula de ATP em vez de 2,5 moléculas de ATP*. O rendimento é menor porque FAD, em vez de NAD^+, é o aceptor de elétrons na glicerol 3-fosfato desidrogenase mitocondrial. O uso de FAD possibilita que elétrons do NADH citoplasmático sejam transportados para as mitocôndrias contra um gradiente de concentração de NADH. O "custo" desse transporte é uma molécula de ATP por dois elétrons. Esse circuito (lançadeira, *shuttle*) da glicerol 3-fosfato desidrogenase é especialmente proeminente na musculatura e, assim, possibilita a manutenção de uma taxa muito elevada de fosforilação oxidativa na musculatura. Na verdade, alguns insetos não têm lactato desidrogenase e são totalmente dependentes do circuito (lançadeira, *shuttle*) do glicerol 3-fosfato para a regeneração do NAD^+ citoplasmático.



Circuito (lançadeira, *shuttle*) do glicerol 3-fosfato

No coração e no fígado, os elétrons do NADH citoplasmático são trazidos para as mitocôndrias pelo circuito ou lançadeira (*shuttle*) do malato-aspartato, que é mediado por dois carreadores de membrana e quatro enzimas (Figura 18.35). Os elétrons são transferidos do NADH no citoplasma para oxaloacetato, formando malato, que atravessa a membrana mitocondrial interna em troca de α-cetoglutarato e, depois, é reoxidado por NAD^+ na matriz para formar NADH em uma reação catalisada pela enzima do ácido cítrico malato desidrogenase. O oxaloacetato resultante não cruza prontamente a membrana mitocondrial interna e uma reação de transaminação (Seção 23.3) é necessária para formar aspartato, que pode ser transportado para o lado citoplasmático em troca de glutamato. O glutamato doa um grupo amino para o oxaloacetato, formando aspartato e α-cetoglutarato. No citoplasma, o aspartato é desaminado para formar oxaloacetato e o ciclo é reiniciado.

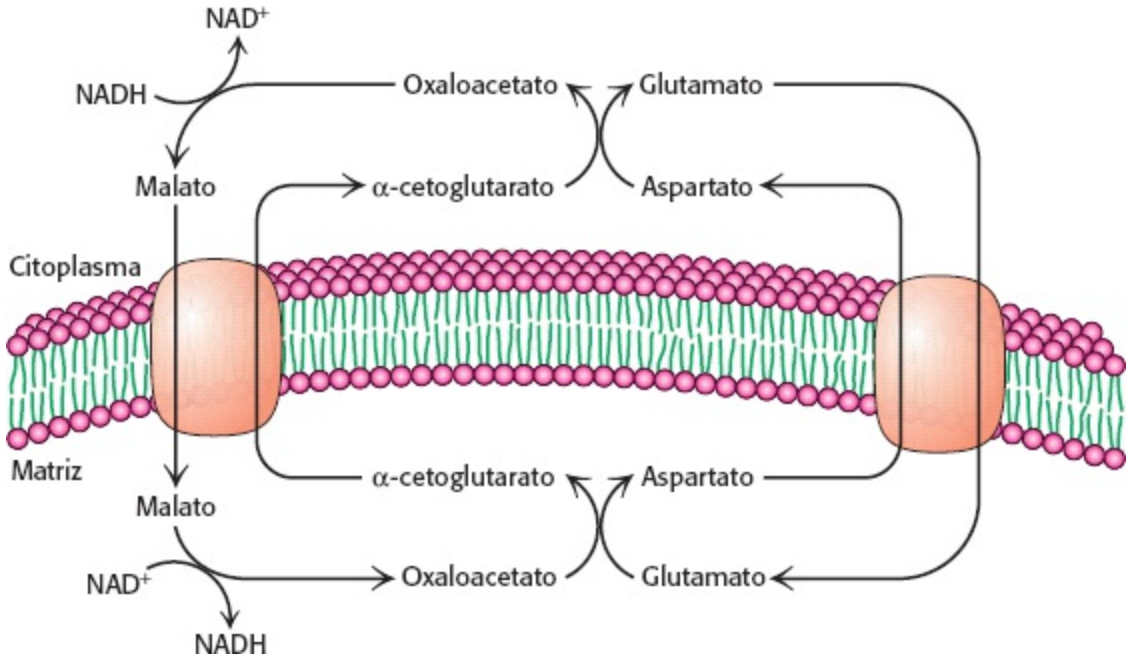
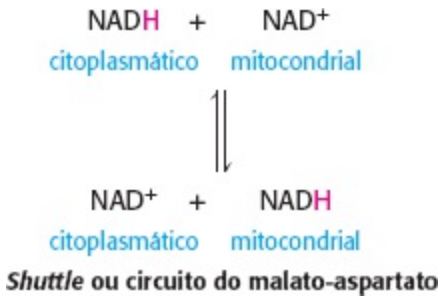


Figura 18.35 Transporte malato-aspartato.



***Shuttle* ou circuito do malato-aspartato**

A entrada de ADP nas mitocôndrias é acoplada à saída de ATP pela ATP-ADP translocase

A principal função da fosforilação oxidativa é a geração de ATP a partir de ADP. ATP e ADP não se difundem livremente através da membrana mitocondrial interna. Como essas moléculas altamente carregadas se movem através da membrana mitocondrial interna para o citoplasma? Uma proteína carreadora específica, a *ATP-ADP translocase*, possibilita que essas moléculas atravessem essa barreira de permeabilidade. Mais importante ainda, os fluxos de ATP e ADP são acoplados. *O ADP só penetra na matriz mitocondrial se o ATP sair, e vice-versa*. Esse processo é realizado pela translocase, um antitransportador:

$$ADP^{3-}_{citoplasma} + ATP^{4-}_{matriz} \rightarrow ADP^{3-}_{matriz} + ATP^{4-}_{citoplasma}$$

A ATP-ADP translocase é extremamente abundante, constituindo aproximadamente 15% da proteína na membrana mitocondrial interna. A abundância é uma manifestação do fato de que os seres humanos trocam o equivalente ao seu peso em ATP todos os dias. A translocase de 30 kDa contém um único sítio de ligação de nucleotídio que alternativamente fica de frente para os lados da matriz e citoplasmático da membrana (Figura 18.36). ATP e ADP ligam-se à translocase sem Mg^{2+} e o ATP tem uma carga elétrica negativa a mais que o ADP. Portanto, na mitocôndria em respiração ativa e com um potencial de membrana positivo, são favorecidos o transporte de ATP para fora da matriz mitocondrial e o transporte de ADP para a matriz. Essa troca de ATP e ADP é "dispendiosa" em termos energéticos, ou seja, cerca de 25% do rendimento energético da transferência de elétrons pela cadeia respiratória é gasto na regeneração do potencial de membrana que é usado por esse processo

de troca. A inibição desse processo também resulta na subsequente inibição da respiração celular (p. 562).

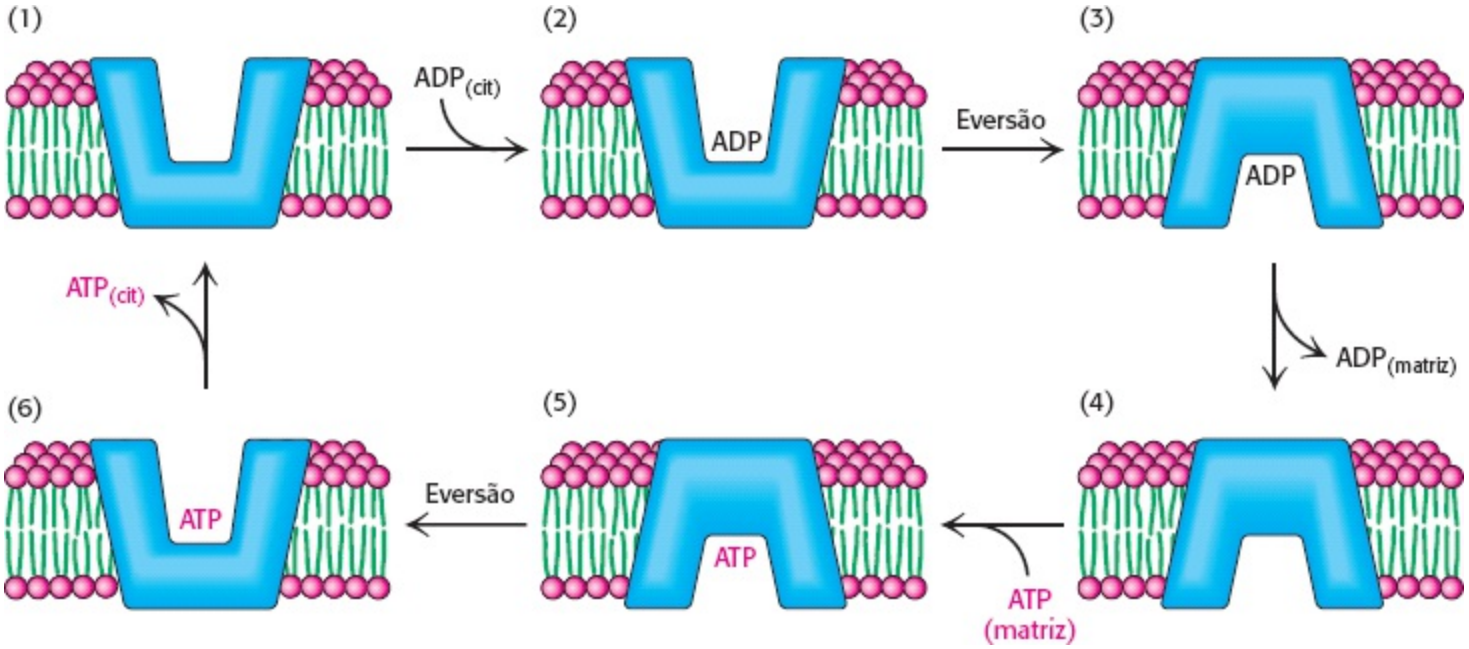


Figura 18.36 Mecanismo da ATP-ADP translocase mitocondrial. A translocase catalisa a entrada acoplada de ADP na matriz e a saída de ATP da matriz. A ligação do ADP (1) do citoplasma favorece a eversão do transportador (2) para liberar ADP para a matriz (3). A ligação subsequente de ATP da matriz à forma evertida (4) favorece a eversão de volta à conformação original (5), liberando ATP para o citoplasma (6).

Os transportadores mitocondriais de metabólitos apresentam uma estrutura tripartite em comum

O exame da sequência de aminoácidos da ATP-ADP translocase revelou que essa proteína consiste em três repetições consecutivas de um módulo de 100 aminoácidos e cada uma dessas repetições parece ter dois segmentos transmembranares. Recentemente, a existência dessa estrutura tripartite foi confirmada pela determinação da estrutura tridimensional desse transportador (Figura 18.37). As hélices transmembrana formam uma estrutura semelhante a uma tenda com o sítio de ligação de nucleotídios (marcado por um inibidor ligado) no centro. Cada uma das três repetições adota uma estrutura semelhante.

A ATP-ADP translocase é apenas um de muitos transportadores mitocondriais de íons e metabólitos com carga elétrica (Figura 18.38). O *carreador fosfato*, que atua com a ATP-ADP translocase, medeia a troca eletroneutra de $H_2PO_4^-$ por OH^-. A ação combinada desses dois carreadores resulta na troca de ADP e P_i citoplasmáticos por ATP da matriz à custa do influxo de um H^+ (devido ao transporte de um OH^- para fora da matriz). Esses dois carreadores, que fornecem os substratos da ATP sintase, estão associados à sintase para formar um grande complexo.

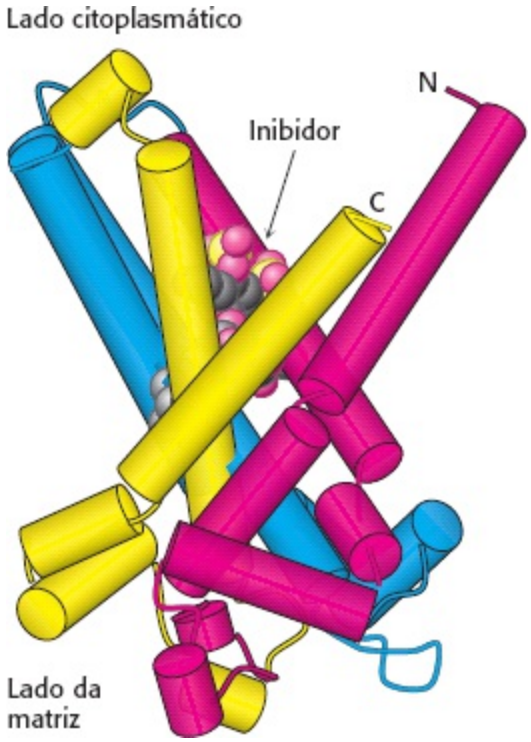


Figura 18.37 Estrutura dos transportadores mitocondriais. A estrutura da ATP-ADP translocase é mostrada. *Observe* que essa estrutura é constituída por três unidades semelhantes (mostradas em vermelho, azul e amarelo) que se juntam para formar um sítio de ligação, aqui ocupado por um inibidor desse transportador. Outros membros da família dos transportadores mitocondriais adotam estruturas tripartites semelhantes. [Desenhada a partir de 10KC.pdb.]

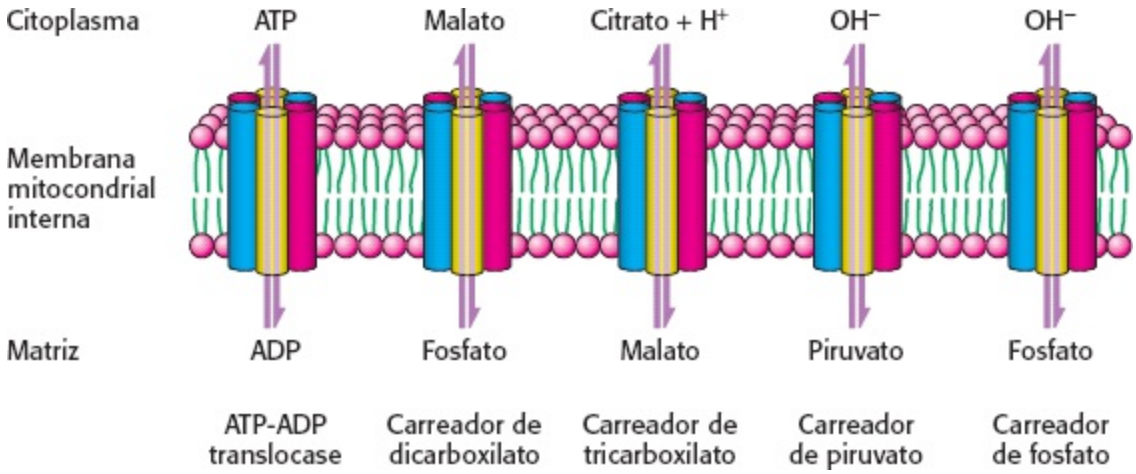


Figura 18.38 Transportadores mitocondriais. Os transportadores (também denominados carreadores) são proteínas transmembranares que carreiam íons e metabólitos com carga elétrica específicos através da membrana mitocondrial interna.

Outros carreadores homólogos também são encontrados na membrana mitocondrial interna. O carreador de dicarboxilato possibilita a exportação de malato, succinato e fumarato da matriz mitocondrial em troca de P_i. O carreador de tricarboxilato troca citrato e H^+ por malato. O piruvato no citoplasma penetra na membrana mitocondrial em troca de OH^- por meio de um carreador de piruvato. No todo, mais de 40 desses carreadores são codificados pelo genoma humano.

18.6 A regulação da respiração celular é dirigida primariamente pela necessidade de ATP

Visto que o ATP é o produto final da respiração celular, as demandas de ATP da célula constituem o determinante final da taxa das vias respiratórias e de seus componentes.

A oxidação completa da glicose produz aproximadamente 30 moléculas de ATP

Agora podemos determinar quantas moléculas de ATP são formadas quando a glicose é totalmente oxidada a CO_2. O número de moléculas de ATP (ou GTP) formadas na glicólise e no ciclo do ácido cítrico é, sem dúvida, conhecido porque é determinado pelas estequiometrias das reações químicas. Em contrapartida, a produção de ATP pela fosforilação oxidativa é menos certa porque as estequiometrias da bomba de prótons, da síntese de ATP e dos processos de transporte de metabólitos não precisam ser números inteiros nem mesmo ter valores fixos. Como já foi mencionado, as melhores estimativas atuais para o número de prótons bombeados para fora da matriz pela NADH-coenzima Q oxidorredutase, pela coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase e pela citocromo *c* oxidase por par de elétrons são dois, quatro e quatro, respectivamente. A síntese de uma molécula de ATP é impulsionada pelo fluxo de aproximadamente três prótons através da ATP sintase. Um próton adicional é consumido no transporte de ATP da matriz para o citoplasma. Assim, aproximadamente 2,5 moléculas de ATP citoplasmático são geradas como resultado do fluxo de um par de elétrons de NADH para O_2. Para os elétrons que entram no nível da coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase, como os provenientes da oxidação de succinato ou NADH citoplasmático, o rendimento é de aproximadamente 1,5 molécula de ATP por par de elétrons. Como se vê na Tabela 18.4, aproximadamente *30 moléculas de ATP são formadas quando a glicose é completamente oxidada a CO_2*; esse valor substitui a estimativa tradicional de 36 moléculas de ATP. A maior parte do ATP, 26 das 30 moléculas formadas, é gerada por fosforilação oxidativa. Devemos lembrar que o metabolismo anaeróbico da glicose produz apenas 2 moléculas de ATP. A eficiência da respiração celular é manifestada pelo fato de que um dos efeitos dos exercícios de resistência, uma prática que demanda muito ATP durante períodos prolongados de tempo, é aumentar o número de mitocôndrias e vasos sanguíneos nos músculos e, assim, aumentar a geração de ATP por fosforilação oxidativa.

A taxa de fosforilação oxidativa é determinada pela demanda de ATP

Como é controlada a taxa da cadeia de transporte de elétrons? Na maioria das condições fisiológicas, o transporte de elétrons é rigidamente acoplada à fosforilação. *De modo geral, os elétrons não fluem através da cadeia de transporte de elétrons até O_2 ao menos que ADP seja simultaneamente fosforilado a ATP*. Quando a concentração de ADP se eleva, como ocorreria no caso da musculatura ativa, a taxa de fosforilação oxidativa aumenta para atender às demandas de ATP dos músculos. A regulação da taxa de fosforilação oxidativa pelo nível de ADP é denominada *controle respiratório* ou *controle de aceptor*. Experimentos em mitocôndrias isoladas demonstram a importância do nível de ADP (Figura 18.39). A taxa de consumo de oxigênio pelas mitocôndrias aumenta significativamente quando ADP é adicionado e, depois, retorna a seu valor inicial quando o ADP adicionado é convertido em ATP.

Tabela 18.4 Rendimento de ATP a partir da oxidação completa da glicose.

Sequência de reação	Produção de ATP por molécula de glicose
Glicólise: conversão de glicose em piruvato (no citoplasma)	

Fosforilação da glicose	−1
Fosforilação da frutose 6-fosfato	−1
Desfosforilação de 2 moléculas de 1,3-BPG	+2
Desfosforilação de 2 moléculas de fosfoenolpiruvato	+2
2 moléculas de NADH são formadas na oxidação de 2 moléculas de gliceraldeído 3-fosfato	
Conversão de piruvato em acetil-CoA (no interior das mitocôndrias)	
2 moléculas de NADH são formadas	
Ciclo do ácido cítrico (no interior das mitocôndrias)	
2 moléculas de adenosina trifosfato são formadas a partir de 2 moléculas de succinil-CoA	+2
6 moléculas de NADH são formadas na oxidação de 2 moléculas cada de isocitrato, α-cetoglutarato e malato	
2 moléculas de $FADH_2$ são formadas na oxidação de 2 moléculas de succinato	
Fosforilação oxidativa (no interior das mitocôndrias)	
2 moléculas de NADH são formadas na glicólise: cada uma produz 1,5 molécula de ATP (pressupondo transporte de NADH pelo circuito ou lançadeira [shuttle] do glicerol 3-fosfato)	+3
2 moléculas de NADH são formadas na descarboxilação oxidativa de piruvato; cada uma produz 2,5 moléculas de ATP	+5
2 moléculas de $FADH_2$ são formadas no ciclo de ácido cítrico; cada uma produz 1,5 molécula de ATP	+3
6 moléculas de NADH são formadas no ciclo de ácido cítrico; cada uma produz 2,5 moléculas de ATP	+15
Rendimento efetivo por molécula de glicose +30	+30

Fonte: O rendimento de ATP da fosforilação oxidativa é baseado nos valores apresentados em P. C. Hinkle, M. A. Kumar, A. Resetar, and D. L. Harris. Biochemistry 30:3576, 1991.

Nota: O valor atual de 30 moléculas de ATP por molécula de glicose substitui o valor anterior de 36 moléculas de ATP. As estequiometrias da bomba de prótons, da síntese de ATP e do transporte de metabólitos devem ser consideradas estimativas. Aproximadamente 2 moléculas de ATP são formadas por molécula de glicose oxidada quando é utilizado o circuito ou lançadeira (shuttle) do malato-aspartato em vez de o glicerol 3-fosfato.

Figura 18.39 Controle respiratório. Os elétrons são transferidos para O_2 apenas se ADP for concomitantemente fosforilado a ATP.

O nível de ADP também influencia a taxa do ciclo de ácido cítrico. Em baixas concentrações de ADP, como nos músculos em repouso, NADH e $FADH_2$ não são consumidos pela cadeia de transporte de elétrons. O ciclo do ácido cítrico torna-se mais lento porque há menos NAD^+ e FAD para alimentar o ciclo. À medida que o nível de ADP aumenta e a fosforilação oxidativa se acelera, NADH e $FADH_2$ são oxidados e o ciclo do ácido cítrico se torna mais ativo. *Os elétrons não fluem das moléculas energéticas para O_2 ao menos que seja necessário sintetizar ATP*. Vemos aqui outro exemplo da importância reguladora da carga energética (Figura 18.40).

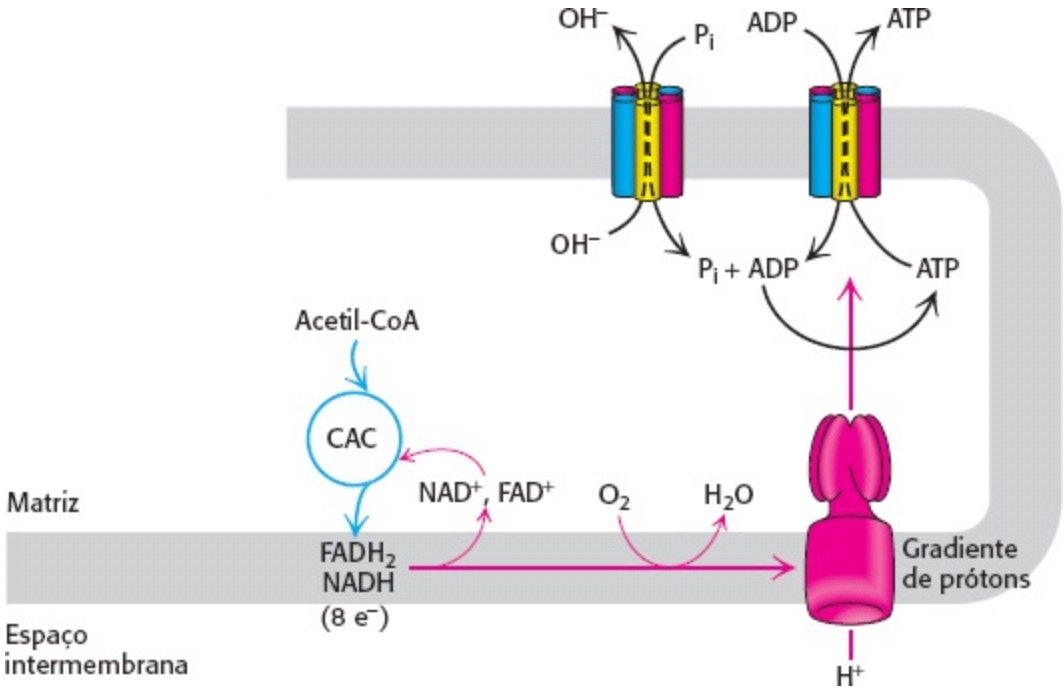


Figura 18.40 A carga energética regula o uso de substratos energéticos. A síntese de ATP a partir de ADP e P_i controla o fluxo de elétrons desde NADH e $FADH_2$ até o oxigênio. A disponibilidade de NAD^+ e FAD, por sua vez, controla a taxa do ciclo de ácido cítrico (CAC).

Desacoplamento regulado resulta na geração de calor

Alguns organismos apresentam a capacidade de desacoplar a fosforilação oxidativa da síntese de ATP para gerar calor. Esse desacoplamento é um meio de manter a temperatura corporal em animais que hibernam, em alguns animais recémnascidos (inclusive nos seres humanos) e em muitos mamíferos adultos, sobretudo aqueles adaptados a climas frios. A planta *Symplocarpus foetidus* utiliza um mecanismo análogo para aquecer suas inflorescências no início da primavera, aumentando

assim a evaporação de moléculas odoríferas que atraem insetos para fertilizar suas flores. Nos animais o desacoplamento ocorre no *tecido adiposo marrom* (TAM), que nada mais é que tecido especializado no processo de *termogênese sem calafrio*. Em contrapartida, o *tecido adiposo branco* (TAB), que constitui a maior parte do tecido adiposo, não participa na termogênese, mas é uma fonte de energia e uma glândula endócrina (Capítulos 26 e 27).

O tecido adiposo marrom é muito rico em mitocôndrias, que frequentemente são denominadas *mitocôndrias da gordura marrom*. O tecido tem aspecto acastanhado devido à combinação dos citocromos de coloração esverdeada nas numerosas mitocôndrias à hemoglobina vermelha presente no sangue que ajuda a carrear o calor por todo o corpo. A membrana mitocondrial interna dessas mitocôndrias contém uma grande quantidade de *proteína desacopladora* (UCP-1) ou *termogenina*, um dímero com subunidades de 33 kDa que se assemelha a ATP-ADP translocase. A UCP-1 forma uma via para o fluxo de prótons provenientes do citoplasma para a matriz. Em suma, a *UCP-1 gera calor ao fazer um curto-circuito na bomba de prótons mitocondrial*. A energia do gradiente de prótons, normalmente capturada como ATP, é liberada na forma de calor à medida que os prótons fluem através de UCP-1 para a matriz mitocondrial. Essa via dissipativa de prótons é ativada quando a temperatura corporal central começa a cair. Em resposta à queda da temperatura, a liberação de hormônios resulta na liberação de ácidos graxos a partir dos triacilgliceróis que por sua vez ativam a termogenina (Figura 18.41).

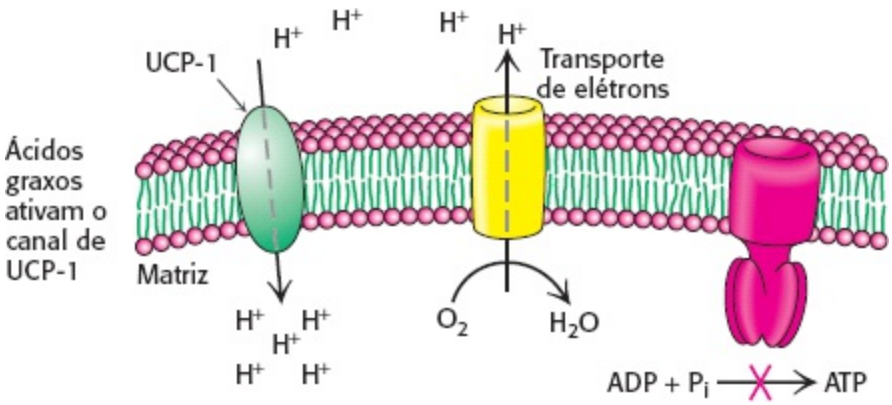


Figura 18.41 Ação de uma proteína desacopladora. A proteína de desacoplamento (UCP-1) gera calor ao permitir o influxo de prótons nas mitocôndrias sem a síntese de ATP.

Nós podemos testemunhar os efeitos da ausência de termogênese sem calafrios ao examinarmos o comportamento dos porcos. Os porcos são mamíferos incomuns porque têm muitos filhotes de cada vez e são os únicos ungulados (animais com cascos) que constroem ninhos para dar à luz. Essas características comportamentais parecem ser resultado de uma deficiência bioquímica. Os porcos não têm a UCP-1 e, portanto, não têm gordura marrom. Os porquinhos dependem de outras formas de termogênese, tais como nidificação, ninhadas grandes e calafrios.

Até recentemente, acreditava-se que os seres humanos adultos não tinham tecido adiposo marrom. Todavia, estudos recentes estabeleceram que os adultos, sobretudo as mulheres, apresentam tecido adiposo marrom no pescoço e na região torácica superior e esse tecido é ativado pelo frio (Figura 18.42). A obesidade resulta em redução do tecido adiposo marrom.

Além da proteína UCP-1, duas outras proteínas desacopladoras já foram identificadas. A UCP-2, cuja sequência é 56% idêntica à da UCP-1, é encontrada em uma ampla variedade de

tecidos. A UCP-3 (57% idêntica a UCP-1 e 73% idêntica a UCP-2) está localizada nos músculos esqueléticos e na gordura marrom. Essa família de proteínas desacopladoras, especialmente UCP-2 e UCP-3, pode participar da homeostasia energética. De fato, os genes de UCP-2 e UCP-3 são mapeados em regiões dos cromossomas de seres humanos e camundongos que foram ligadas a obesidade, apoiando a noção de que funcionam como uma maneira de regular o peso corporal.

A fosforilação oxidativa pode ser inibida em muitos estágios

Muitos venenos potentes e letais exercem seus efeitos por meio de inibição da fosforilação oxidativa em um de vários locais diferentes (Figura 18.43).

1. *Inibição da cadeia de transporte de elétrons*. A *rotenona*, que é utilizada como veneno para insetos e peixes, e *amobarbital*, um sedativo barbitúrico, bloqueiam a transferência de elétrons na NADH-coenzima Q oxidorredutase e, assim, impedem a utilização de NADH como substrato. A rotenona, um inibidor da cadeia de transporte de elétrons, participa, juntamente com a suscetibilidade genética, no desenvolvimento da doença de Parkinson. Na presença de retonona e amobarbital, o fluxo de elétrons resultante da oxidação do succinato não é comprometido porque esses elétrons entram através de QH_2, além do bloqueio. A *antimicina A* interfere no fluxo de elétrons provenientes do citocromo b_H na coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase. Além disso, o fluxo de elétrons na citocromo *c* oxidase pode ser bloqueado por *cianeto* (CN^-), *azida* (N_3^-) e *monóxido de carbono* (CO). O cianeto e a azida reagem com a forma férrica do heme a_3, enquanto o monóxido de carbono inibe a forma ferrosa. A inibição da cadeia de transporte de elétrons também inibe a síntese de ATP porque a força próton-motriz não pode mais ser gerada.

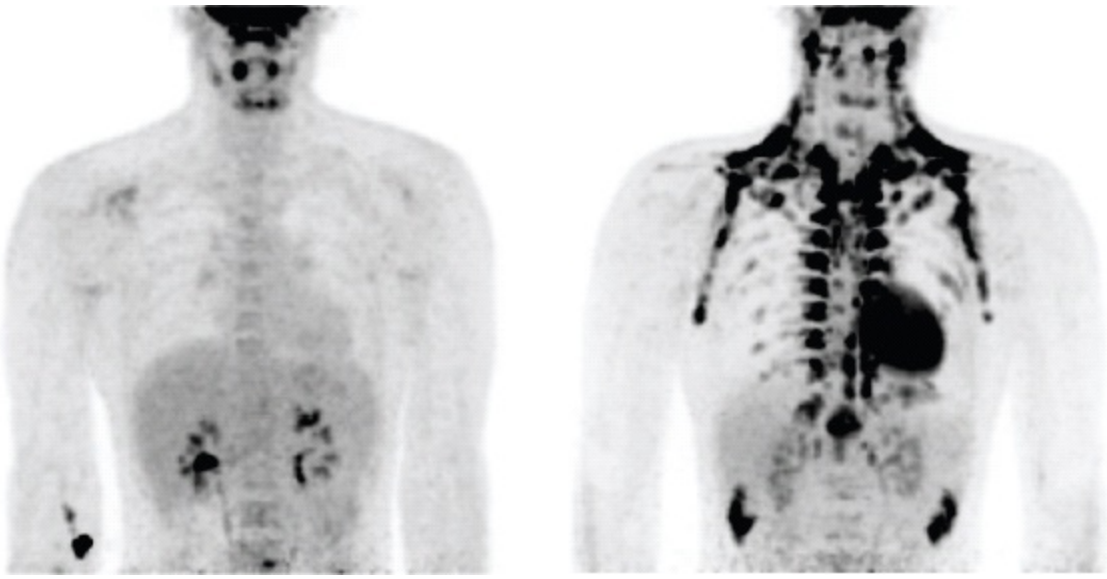


Figura 18.42 O tecido adiposo marrom é revelado na exposição ao frio. Os resultados da PET-TC mostram a captação e a distribuição de ^{18}F-fluorodesoxiglicose (^{18}F-FDG) no tecido adiposo. Os padrões de captação de ^{18}F-FDG no mesmo indivíduo são extremamente diferentes em condições termoneutras (à esquerda) e após exposição ao frio (à direita). [Cortesia de Wouter van Marken Lichtenbelt. Copyright 2009 Massachusetts Medical Society. Todos os direitos reservados.]

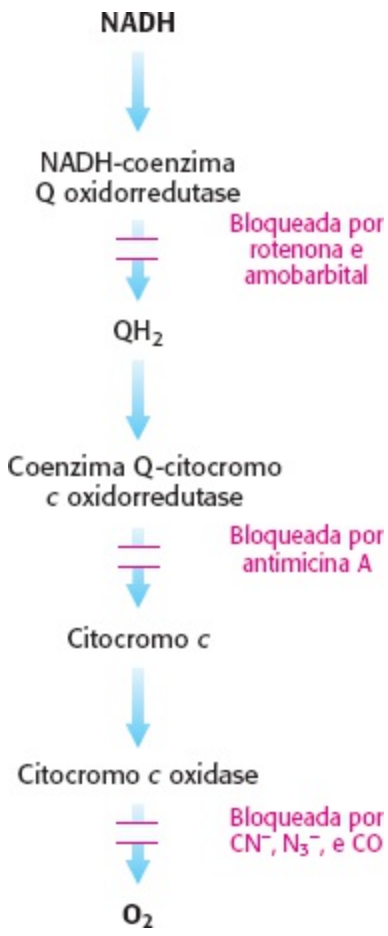
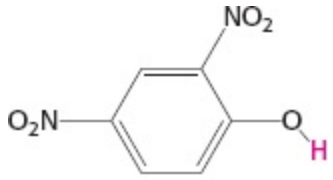


Figura 18.43 Locais de ação de alguns inibidores do transporte de elétrons.

2. *Inibição da ATP sintase*. A oligomicina, um antibiótico usado como antifúngico, e a diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) impedem o influxo de prótons através da ATP sintase. Se mitocôndrias com respiração ativa são expostas a um inibidor da ATP sintase, a cadeia de transporte de elétrons para. Esta observação claramente ilustra que o transporte de elétrons e a síntese de ATP são normalmente fortemente acopladas.

3. Desacoplamento do transporte de elétrons da síntese de ATP. O acoplamento rígido do transporte de elétrons com a fosforilação nas mitocôndrias pode ser rompido por 2,4-dinitrofenol (DNP) e por determinados compostos ácidos aromáticos. Essas substâncias carreiam prótons através da membrana mitocondrial interna, a favor de seu gradiente de concentração. Quando existem esses agentes desacopladores, o transporte de elétrons de NADH para O_2 procede da forma normal, mas ATP não é formado pela ATP sintase mitocondrial porque a força próton-motriz através da membrana mitocondrial interna é continuamente dissipada. Essa perda do controle respiratório resulta em aumento do consumo de oxigênio e da oxidação de NADH. Na verdade, quando ocorre a ingestão acidental de agentes desacopladores, uma grande quantidade de substratos metabólicos é consumida, mas não é capturada energia na forma de ATP. Em vez disso, energia é liberada na forma de calor. O DNP é o ingrediente ativo em alguns herbicidas e fungicidas. É digno de nota que algumas pessoas consomem DNP com o propósito de perder peso apesar do fato de a FDA ter banido seu uso em 1938. Existem também relatos de que soldados soviéticos receberam DNP para mantê-los aquecidos durante os longos invernos russos. Os desacopladores químicos são contrapartes não fisiológicas e não reguladas das proteínas desacopladoras.



2,4-dinitrofenol (DNP)

4. *Inibição da exportação de ATP*. A ATP-ADP translocase é inibida especificamente por concentrações muito baixas de *atractilosídeo* (um glicosídio vegetal) ou *ácido bongkréquico* (um antibiótico proveniente do mofo). O atractilosídeo liga-se à translocase quando seu sítio de ligação ao nucleotídio fica de frente para o citoplasma, enquanto o ácido bongkréquico se liga quando esse sítio fica de frente para a matriz mitocondrial. A fosforilação oxidativa é interrompida logo após a adição de um desses inibidores, mostrando que a ATP-ADP translocase é essencial para a manutenção de níveis adequados de ADP para aceitar a energia associada à força próton-motriz.

Doenças mitocondriais estão sendo descobertas

O número de doenças que podem ser atribuídas a mutações mitocondriais está crescendo, como também a nossa compreensão da bioquímica e da genética das mitocôndrias. Estima-se que a prevalência das doenças mitocondriais varia de 10 a 15 por 100.000 pessoas, aproximadamente o equivalente à prevalência das distrofias musculares. A primeira doença mitocondrial a ser compreendida foi a *neuropatia óptica hereditária de Leber* (NOHL), uma forma de cegueira que ocorre em pessoas de meia-idade como resultado de mutações no complexo I. Algumas dessas mutações comprometem a utilização de NADH, enquanto outras bloqueiam a transferência de elétrons para ubiquinona (Q). As mutações no complexo I são a causa mais frequente de doenças mitocondriais. O acúmulo de mutações nos genes mitocondriais ao longo de várias décadas contribuiria para o envelhecimento, os distúrbios degenerativos e o câncer.

Um ovo humano alberga várias centenas de milhares de moléculas de DNA mitocondrial, enquanto um espermatozoide contribui apenas com algumas centenas e, portanto, tem pouca participação no genoma mitocondrial. Como as mitocôndrias de herança materna são encontradas em grande número e nem todas as mitocôndrias são afetadas, as patologias dos mutantes mitocondriais podem ser muito complexas. Mesmo em uma única família carreando uma mutação idêntica, flutuações aleatórias na porcentagem de mitocôndrias com a mutação resultam em grandes variações na natureza e na gravidade dos sinais e sintomas da condição patológica, assim como no momento de seu aparecimento. À medida que aumenta a porcentagem de mitocôndrias defeituosas, a capacidade de geração de energia diminui até que, em algum limiar, a célula não consegue mais funcionar apropriadamente. Defeitos na respiração celular são duplamente perigosos. Não apenas a transdução de energia diminui, como também aumenta a probabilidade da geração de espécies reativas de oxigênio. Os órgãos que são muito dependentes da fosforilação oxidativa, como o sistema nervoso e o coração, são os mais vulneráveis a mutações no DNA mitocondrial.

As mitocôndrias têm uma participação essencial na apoptose

Durante o desenvolvimento ou nos casos de lesão celular significativa, células individuais nos organismos multicelulares sofrem *apoptose* (*morte celular programada*). As mitocôndrias atuam como centros de controle que regulam esse processo. Embora os detalhes ainda não tenham sido

estabelecidos, a membrana externa das mitocôndrias lesionadas se torna muito permeável, um processo denominado *permeabilização da membrana mitocondrial externa* (PMME). Essa permeabilização é incitada por uma família de proteínas (família Bcl) que foram descobertas inicialmente por causa de sua participação no câncer. Um dos ativadores mais potentes da apoptose, o citocromo *c*, sai das mitocôndrias e interage com o fator apoptótico ativador de peptidase 1 (APAF-1, *do inglês apoptotic peptidase-activating factor 1*), que resulta na formação do *apoptossoma*. O apoptossoma recruta e ativa uma proteína proteolítica denominada caspase 9, um membro da família de cisteína proteases (Seção 9.1), que por sua vez ativa uma cascata de outras caspases. Cada tipo de caspase destrói um alvo específico, tais como as proteínas que mantêm a estrutura celular. Outro alvo é uma proteína que inibe uma enzima que destrói DNA (uma enzima denominada DNAse ativada por caspase ou CAD, *do inglês caspase-activated DNAse*), liberando a CAD para fragmentar o material genético. Essa cascata de enzimas proteolíticas foi descrita como "morte decorrente de milhares de minúsculos cortes".

A transmissão de potência por gradientes de prótons é um tema central da bioenergética

O principal conceito apresentado neste capítulo é que a transferência mitocondrial de elétrons e a síntese de ATP são conectadas por um gradiente de prótons transmembrana. A síntese de ATP nas bactérias e nos cloroplastos também é impulsionada por gradientes de prótons. Na verdade, os gradientes de prótons impulsionam vários processos que demandam energia, tais como o transporte ativo de íons cálcio pelas mitocôndrias, a entrada de alguns aminoácidos e açúcares nas bactérias, a rotação dos flagelos bacterianos e a transferência de elétrons de $NADP^+$ para NADPH. Os gradientes de prótons também podem ser empregados para gerar calor, como na hibernação. É evidente que os *gradientes de prótons são a fonte central de energia livre nos sistemas biológicos* (Figura 18.44). Mitchell observou que a força próton-motriz é uma reserva extraordinariamente simples e efetiva de energia livre porque exige apenas uma delicada membrana lipídica fechada entre duas fases aquosas.

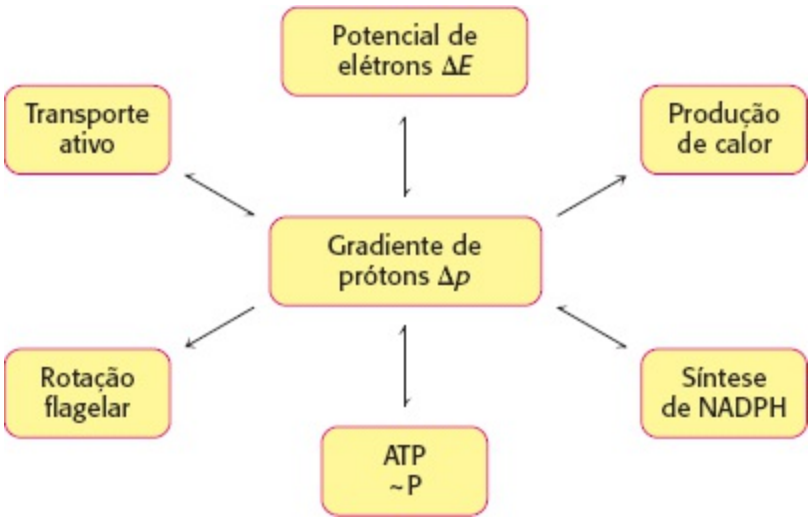


Figura 18.44 O gradiente de prótons é uma forma interconversível de energia livre.

Resumo

18.1 A fosforilação oxidativa nos eucariotos ocorre nas mitocôndrias

As mitocôndrias produzem a maior parte do ATP necessário às células aeróbicas graças à associação das reações do ciclo do ácido cítrico, que ocorrem na matriz mitocondrial, e da fosforilação oxidativa, que ocorre na membrana mitocondrial interna. As mitocôndrias são descendentes de uma bactéria de vida livre que estabeleceu uma relação simbiótica com outra célula.

18.2 A fosforilação oxidativa depende da transferência de elétrons

Na fosforilação oxidativa, a síntese de ATP está acoplada ao fluxo de elétrons de NADH ou $FADH_2$ para O_2 por um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna. O fluxo de elétrons através de três complexos transmembrana de orientação assimétrica resulta no bombeamento de prótons para fora da matriz mitocondrial e na geração de um potencial de membrana. ATP é sintetizado quando os prótons fluem de volta para a matriz através de um canal em um complexo sintetizador de ATP denominado ATP sintase (também conhecido como F_0 F_1-ATPase). A fosforilação oxidativa exemplifica um tema fundamental da bioenergética: a transmissão de energia livre pelos gradientes de prótons.

18.3 A cadeia respiratória é constituída por quatro complexos: três bombas de prótons e uma ligação física com o ciclo do ácido cítrico

Os carreadores de elétrons na "*montagem*" respiratória da membrana mitocondrial interna são quinonas, flavinas, complexos ferro-enxofre, grupos heme dos citocromos e íons cobre. Elétrons de NADH são transferidos para o grupo prostético FMN da NADH-coenzima Q oxidorredutase (complexo I), o primeiro dos quatro complexos. Essa oxidorredutase também contém centros Fe-S. Os elétrons emergem em QH_2, a forma reduzida da ubiquinona (Q). A enzima succinato desidrogenase do ciclo do ácido cítrico é um componente do complexo succinato-coenzima Q redutase (complexo II), que doa elétrons de $FADH_2$ para Q com o propósito de formar QH_2. Esse carreador hidrofóbico extremamente móvel transfere seus elétrons para a coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase (complexo III), um complexo que contém os citocromos *b* e c_1 e um centro de Fe-S. Esse complexo reduz citocromo c, uma proteína periférica hidrossolúvel de membrana. O citocromo *c*, como a coenzima Q, é um carreador móvel de elétrons, os transferindo depois para a citocromo *c* oxidase (complexo IV). Esse complexo contém citocromos *a* e a_3 e três íons cobre. Um íons ferro hêmico e um íon cobre. Um íon ferro hêmico e um íon cobre nessa oxidase transferem elétrons para O_2, o aceptor final, para formar H_2O.

18.4 Um gradiente de prótons impulsiona a síntese de ATP

O fluxo de elétrons através dos complexos I, III e IV resulta na transferência de prótons do lado da matriz para o lado citoplasmático da membrana mitocondrial interna. Uma força próton-motriz constituída por um gradiente de pH (lado da matriz básico) e um potencial de membrana (lado da matriz negativo) é assim gerada. O fluxo de prótons de volta para o lado da matriz através da ATP sintase impulsiona a síntese de ATP. O complexo enzimático é um "motor" molecular composto por duas unidades operacionais: um componente rotacional e um componente estático. A rotação da subunidade γ induz alterações estruturais na subunidade β que resulta na síntese e na liberação de ATP da enzima. O influxo de prótons proporciona a

força necessária para a rotação.

O fluxo de dois elétrons através da NADH-coenzima Q oxidorredutase, da coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase e da citocromo *c* oxidase gera um gradiente suficiente para sintetizar 1, 0,5 e 1 molécula de ATP, respectivamente. Assim sendo, 2,5 moléculas de ATP são formadas por molécula de NADH oxidada na matriz mitocondrial, enquanto apenas 1,5 molécula de ATP é formada por molécula de $FADH_2$ oxidada porque seus elétrons entram na cadeia em QH_2, após o primeiro local de bombeamento de prótons.

18.5 Muitos circuitos ou lançadeiras (*shuttles*) possibilitam o movimento através das membranas mitocondriais

As mitocôndrias utilizam inúmeros transportadores (ou carreadores) para deslocar moléculas através da membrana mitocondrial interna. Os elétrons de NADH citoplasmático são transferidos para dentro das mitocôndrias pelo circuito (lançadeira, *shuttle*) do glicerol fosfato para formar $FADH_2$ a partir de FAD ou pela lançadeira do malato aspartato para formar NADH mitocondrial. A entrada de ADP na matriz mitocondrial é acoplada à saída de ATP pela ATP-ADP translocase, um carreador impulsionado pelo potencial de membrana.

18.6 A regulação da respiração celular é dirigida primariamente pela necessidade de ATP

Aproximadamente 30 moléculas de ATP são geradas quando uma molécula de glicose é completamente oxidada a CO_2 e H_2O. Normalmente o transporte de elétrons é rigidamente acoplado à fosforilação. NADH e $FADH_2$ são oxidados apenas se ADP for simultaneamente fosforilado a ATP, uma forma de regulação denominada controle respiratório ou controle de aceptor. Já foram identificadas proteínas que desacoplam o transporte de elétrons e a síntese de ATP para a geração de calor. Agentes desacopladores como o DNP também conseguem comprometer esse processo; eles dissipam o gradiente de prótons ao carrear prótons através da membrana mitocondrial interna.

Palavras-chave

apoptose (morte celular programada) (p. 563)
apoptossoma (p. 563)
ATP sintase (complexo V, F_1F_0 ATPase) (p. 548)
ATP-ADP translocase (adenina nucleotídio translocase, ANT) (p. 556)
cadeia de transporte de elétrons (p. 532)
caspase (p. 563)
catalase (p. 546)
centro de Rieske (p. 540)
ciclo Q (p. 540)
circuito (lançadeira, *shuttle*) do glicerol 3-fosfato (p. 555)
circuito (lançadeira, *shuttle*) do malatoaspartato (p. 555)
citocromo *c* (Cit c) (p. 539)
citocromo *c* oxidase (complexo IV) (p. 541)
coenzima Q (Q, ubiquinona) (p. 532)
coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase (complexo III) (p. 539)

controle respiratório (controle de aceptor) (p. 559)
flavina mononucleotídio (FMN) (p. 537)
força próton-motriz (p. 529)
fosforilação oxidativa (p. 529)
NADH-coenzima Q oxidorredutase (complexo I) (p. 537)
permeabilização da membrana mitocondrial externa (PMME) (p. 563)
pool de Q (p. 537)
potencial de redução (redox, oxidaçãoredução, oxidorredução, E'_0) (p. 532)
proteína desacopladora (UCP) (p. 560)
proteína ferro-enxofre (ferro não hêmico) (p. 538)
respiração celular (p. 530)
succinato-coenzima Q redutase (complexo II) (p. 539)
superóxido dismutase (p. 545)

Questões

1. *Respirar ou fermentar?* Compare fermentação e respiração no tocante a doadores de elétrons e aceptores de elétrons.

2. *Estados de referência*. O potencial de oxidação-redução padrão para a redução de O_2 a H_2O é apresentado na Tabela 18.1 como sendo 0,82 V. Todavia, o valor apresentado nos livros de química é 1,23 V. Explique essa diferença.

3. *Menos elétrons energéticos*. Por que os elétrons carreados por $FADH_2$ não são tão ricos em energia quanto os carreados por NADH? Qual é a consequência dessa diferença?

4. *Agora prove*. Calcule a energia liberada pela redução de O_2 pelo $FADH_2$.

5. *Restrição termodinâmica*. Compare os valores de $\Delta G^{o'}$ para a oxidação de succinato por NAD^+ e por FAD. Use os dados apresentados na Tabela 18.1 para descobrir o E'_0 dos pares NAD^+NADH e fumarato-succinato e parta do pressuposto que o E'_0 do par redox FAD-$FADH_2$ é quase 0,05 V. Por que é FAD em vez de NAD^+ o aceptor de elétrons na reação catalisada pela succinato desidrogenase?

6. *O benfeitor e o beneficiado.* Identifique o oxidante e o redutor na seguinte reação:

$$\text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{lactato} + \text{NAD}^+$$

7. *Duas alternativas equivalentes ou indiferentes*. Como o potencial redox ($\Delta E'_0$) está relacionado com a alteração da energia livre de uma reação ($\Delta G^{o'}$)?

8. *Localização, localização, localização.* O ferro é um componente de muitos dos carreadores de elétrons da cadeia de transporte de elétrons. Como ele consegue participar em várias reações redox acopladas se o valor de E'_0 é + 0,77 V, como é mostrado na Tabela 18.1.

9. *Vamos organizar*. Coloque os seguintes componentes da cadeia de transporte de elétrons em sua ordem correta: (a) citocromo *c*; (b) coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase; (c) NADH-coenzima Q redutase; (d) citocromo *c* oxidase; (e) ubiquinona.

10. *Corresponda as duas colunas*:

(a) Complexo I__ 1. Coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase

(b) Complexo II__ 2. Coenzima Q

(c) Complexo III__ 3. Succinato-coenzima Q redutase

(d) Complexo IV__ 4. NADH-coenzima Q oxidorredutase

(e) Ubiquinona__ 5. Citocromo *c* oxidase

11. *Considerações estruturais.* Explique por que a coenzima Q é um carreador efetivo de elétrons móveis na cadeia de transporte de elétrons.

12. *Inibidores.* A rotenona inibe o fluxo de elétrons através da NADH-coenzima Q oxidorredutase. A antimicina A bloqueia o fluxo de elétrons entre os citocromos *b* e c_1. O cianeto bloqueia o fluxo de elétrons através da citocromo *c* oxidase até O_2. Preveja o estado relativo de oxidação-redução de cada um dos seguintes componentes da cadeia respiratória nas mitocôndrias tratadas com cada um dos seguintes inibidores: NAD^+; NADH-coenzima Q oxidorredutase; coenzima Q; citocromo c_1; citocromo *c* e citocromo *a*.

13. *Há boatos de que era o medicamento favorito de Elvis Presley*. O amobarbital é um sedativo barbitúrico que inibe o fluxo de elétrons através do complexo I. Como o acréscimo de amobarbital a mitocôndrias respirando ativamente influenciaria os estados relativos de oxidação-redução dos componentes da cadeia de transporte de elétrons e do ciclo do ácido cítrico?

14. *Eficiência.* Qual é a vantagem de ter complexos I, III e IV associados entre si na forma de um respirassoma?

15. *Não confunda as espécies reativas de oxigênio (ROS) e os roedores de tamanho incomum (Rous,* do inglês *rodents of unusual size)*. Quais são as espécies reativas de oxigênio e porque elas são tão deletérias para as células?

16. *Retorno de recursos*. Os seres humanos possuem apenas cerca de 250 g de ATP; contudo, até um preguiçoso precisa de aproximadamente 83 kg de ATP para abrir um saquinho de batatas fritas e usar o controle remoto. Como é conciliada essa discrepância entre a demanda e os recursos disponíveis?

17. *Coleta energética.* Qual é o rendimento de ATP quando cada um dos seguintes substratos é completamente oxidado a CO_2 por um homogenado de células de mamíferos? Parta do pressuposto de que a glicólise, o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa estão plenamente ativos.

(a) Piruvato

(b) Lactato

(c) Frutose 1,6-bisfosfato

(d) Fosfoenolpiruvato

(e) Galactose

(f) Di-hidroxiacetona fosfato

18. *Venenos potentes*. Qual é o efeito de cada um dos seguintes inibidores no transporte de elétrons e na formação de ATP pela cadeia respiratória?

(a) Azida

(b) Atractilosídeo

(c) Rotenona

(d) DNP

(e) Monóxido de carbono

(f) Antimicina A

19. *Um problema de acoplamento*. Qual é a base mecanicista da observação de que os inibidores da ATP sintase também promovem a inibição da cadeia de transporte de elétrons?

20. *Deslocamento browniano de moléculas*. Qual é a causa da rotação das subunidades C da ATP sintase? O que determina a direção da rotação?

21. *Vias alternativas*. O sinal metabólico mais comum de doenças mitocondriais é a acidose láctica. Por quê?

22. *Conexões*. Como a inibição da ATP-ADP translocase influencia o ciclo do ácido cítrico e a glicólise?

23. *Consumo de O_2*. A fosforilação oxidativa nas mitocôndrias é, com frequência, monitorada por meio da determinação do consumo de oxigênio. Quando a fosforilação oxidativa está evoluindo rapidamente, as mitocôndrias consomem oxigênio rapidamente. Se houver pouca fosforilação oxidativa, apenas pouco oxigênio é consumido, você recebe uma suspensão de mitocôndrias isoladas e é orientado a acrescentar os seguintes compostos na ordem de *a* a *h*. Com o acréscimo de cada composto, todos os compostos previamente adicionados permanecem na solução. Preveja o efeito de cada acréscimo no consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas.

(a) Glicose

(b) ADP + P_i

(c) Citrato

(d) Oligomicina

(e) Succinato

(f) Dinitrofenol

(g) Rotenona

(h) Cianeto

24. *Razões P:O*. O número de moléculas de fosfato inorgânico incorporadas à forma orgânica por átomo de oxigênio consumido, denominada *razão P:O*, foi utilizada frequentemente como um índice da fosforilação oxidativa.

(a) Qual é a correlação entre a razão P:O e a razão do número de prótons translocados por par de elétrons (H^+ /2 e^-) e a razão do número de prótons necessários para sintetizar ATP e transportá-lo para o citoplasma (P/H^+)?

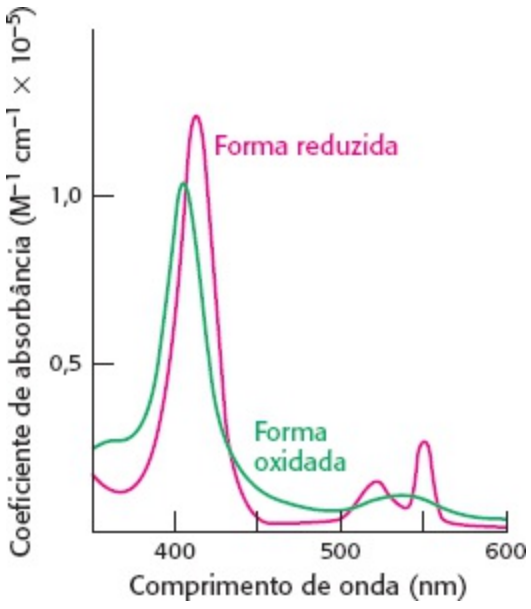
(b) Quais são as razões P:O para elétrons doados por NADH da matriz e por succinato?

25. *Antídoto para o cianeto*. A administração imediata de nitrito é uma medida terapêutica extremamente efetiva para o envenenamento por cianeto. Qual é a base da ação desse antídoto? (Dica: nitrito oxida ferroemoglobina a ferriemoglobina.)

26. *Mitocôndrias fugitivas 1*. Suponha que as mitocôndrias de um paciente oxidem NADH a despeito da existência ou não de ADP. A razão P:O da fosforilação oxidativa dessas mitocôndrias é inferior ao normal. Preveja as prováveis manifestações desse distúrbio.

27. *Dispositivo de reciclagem*. O componente citocromo *b* da coenzima Q-citocromo *c* oxidorredutase possibilita que os dois elétrons de QH_2 sejam efetivamente utilizados na geração da força próton-motriz. Cite outro dispositivo de reciclagem no metabolismo que traga um produto potencialmente inútil de volta ao metabolismo.

28. *Ponto de cruzamento*. O local preciso de ação de um inibidor da cadeia respiratória pode ser revelado pela técnica de cruzamento (*crossover*). Britton Chance elaborou interessantes métodos espectroscópicos para determinar as proporções das formas oxidada e reduzida de cada carreador. Essa determinação é exequível porque as formas apresentam espectros de absorção distintos, como se pode ver no gráfico associado para o citocromo *c*. Você recebe um novo inibidor e descobre que sua adição a mitocôndrias respirando faz com que os carreadores entre NADH e QH_2 se tornem mais reduzidos e aqueles entre o citocromo *c* e O_2 se tornem mais oxidados. Onde seu inibidor atua?



29. *Mitocôndrias fugitivas 2*. Anos atrás, agentes desacopladores foram preconizados como excelentes remédios para emagrecer. Explique o motivo dessa alegação e os motivos de sua rejeição. Por que os fabricantes de antiperspirantes poderiam apoiar essa ideia?

30. *Tudo está conectado* (princípio de exclusão de Pauli). Se mitocôndrias ativamente respirando forem expostas a um inibidor da ATP-ADP translocase, a cadeia de transporte de elétrons parará de funcionar. Por quê?

31. *Como identificar a inibição*. Você é solicitado para determinar se uma substância química é um inibidor da cadeia de transporte de elétrons ou se é um inibidor da ATP sintase. Elabore um experimento para fazer essa determinação.

32. *A cada um segundo suas necessidades* (Karl Marx). Já foi mencionado que as mitocôndrias das células musculares frequentemente apresentam mais cristas do que as mitocôndrias dos hepatócitos. Apresente uma explicação para essa observação.

33. *Os opostos se atraem*. Um resíduo de arginina (Arg 210) na subunidade **a** da ATP sintase está próximo ao resíduo aspartato (Asp 61) no canal de prótons do lado da matriz. Como o Arg 210 poderia auxiliar no fluxo de prótons?

34. *Subunidades **c** variáveis*. Lembre-se de que o número de subunidades **c** no anel **c** parece variar entre 10 e 14. Esse número é significativo porque determina o número de prótons que têm de ser transportados para gerar uma molécula de ATP. Cada rotação de 360° da subunidade γ resulta na síntese e na liberação de três moléculas de ATP. Assim, se existirem 10 subunidades **c** no anel (como foi observado na estrutura cristalina da ATP sintase mitocondrial de levedura), cada ATP gerado exigirá o transporte de 10/3 = 3,33 prótons. Quantos prótons serão necessários para formar ATP se o anel tiver 12 subunidades **c**? E se tiver 14 subunidades **c**?

35. *Contraintuitivo*. Em algumas condições já foi observado que a ATP sintase funciona, na verdade, ao contrário. Como essa situação afetaria a força próton-motriz?

36. *Etiologia? O que quer dizer isso?* O que o fato de que a rotenona parece aumentar a suscetibilidade à doença de Parkinson indica sobre a etiologia da doença de Parkinson?

37. *Exacerbação da diferença*. Por que a ATP-ADP translocase (também denominada adenina nucleotídio translocase ou ANT) precisa utilizar formas livres de ATP e ADP e Mg^{2+}?

38. *Controle respiratório*. A taxa de consumo de oxigênio pelas mitocôndrias aumenta consideravelmente quando ADP é acrescido e, depois, retorna ao seu valor inicial quando o ADP adicionado é convertido a ATP (ver Figura 18.39). Qual é a causa da diminuição da taxa de consumo de oxigênio pelas mitocôndrias?

39. *Iguais, mas diferentes*. Por que a troca eletroneutra de $H_2PO_4^-$ por OH^- é indistinguível do simporte eletroneutro de $H_2PO_4^-$ e H^+ ?

40. *Múltiplos usos*. Dê um exemplo da utilização da força próton-motriz em outras funções além da síntese de ATP.

Questões | Integração de capítulos

41. *Apenas obedeça às leis*. Por que subunidades F_1 isoladas de ATP sintase catalisam a hidrólise de ATP?

42. *A localização correta*. Algumas quinases citoplasmáticas, enzimas que fosforilam substratos à custa de ATP, ligam-se a canais aniônicos dependentes de voltagem. Qual poderia ser a vantagem desse tipo de ligação?

43. *Sem trocas*. Camundongos totalmente sem ATP-ADP translocase (ANT^-/ANT^-) podem ser

criados graças à técnica nocaute gênico *(knockout)*. Vale a pena mencionar que esses camundongos são viáveis, contudo, apresentam as seguintes condições patológicas: (1) níveis séricos elevados de lactato, alanina e succinato; (2) pouco transporte de elétrons e (3) uma elevação de seis a oito vezes dos níveis mitocondriais de H_2O_2 em comparação com os dos camundongos normais. Apresente uma explicação bioquímica plausível para cada uma dessas condições.

44. *Talvez você não deva tomar suas vitaminas*. Exercícios físicos comprovadamente aumentam a sensibilidade à insulina e melhoram o controle do diabetes melito do tipo 2 (Capítulo 27). A pesquisa recente sugere que o consumo de vitaminas antioxidantes poderia reduzir os efeitos benéficos do exercício físico no que diz respeito à proteção contra as espécies reativas de oxigênio.

(a) O que são as vitaminas antioxidantes?

(b) Como os exercícios físicos protegem contra as espécies reativas de oxigênio?

(c) Explique como as vitaminas poderiam contrabalançar os efeitos benéficos dos exercícios físicos.

Questões | Interpretação de dados

45. *Doença mitocondrial*. Foi identificada uma mutação em um gene mitocondrial que codifica um componente da ATP sintase. As pessoas portadoras dessa mutação sofrem de fraqueza muscular, ataxia e retinite pigmentar. Uma biopsia de tecido foi realizada em cada um dos três pacientes com essa mutação e foram isoladas partículas submitocondriais que eram capazes de síntese de ATP à base de succinato. Primeiro foi determinada a atividade da ATP sintase quando do acréscimo de succinato e os seguintes resultados foram obtidos

	Atividade da ATP sintase (nmol de ATP formado min^{-1} mg^{-1})
Controles	3,0
Paciente 1	0,25
Paciente 2	0,11
Paciente 3	0,17

(a) Qual é o propósito do acréscimo de succinato?

(b) Qual é o efeito da mutação na síntese de ATP acoplada ao succinato?

A seguir, a atividade ATPase da enzima foi determinada por meio de incubação das partículas submitocondriais com ATP na ausência de succinato.

	Hidrólise de ATP (nmol de ATP hidrolisado min^{-1} mg^{-1})
Controles	33
Paciente 1	30
Paciente 2	25

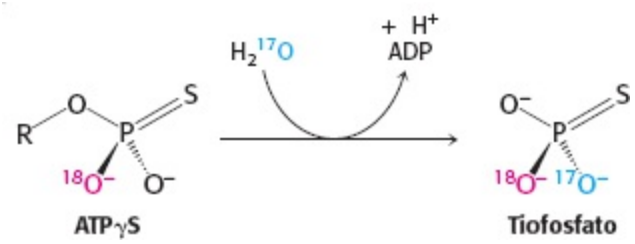
(c) Por que o succinato foi omitido da reação?

(d) Qual é o efeito da mutação na hidrólise de ATP?

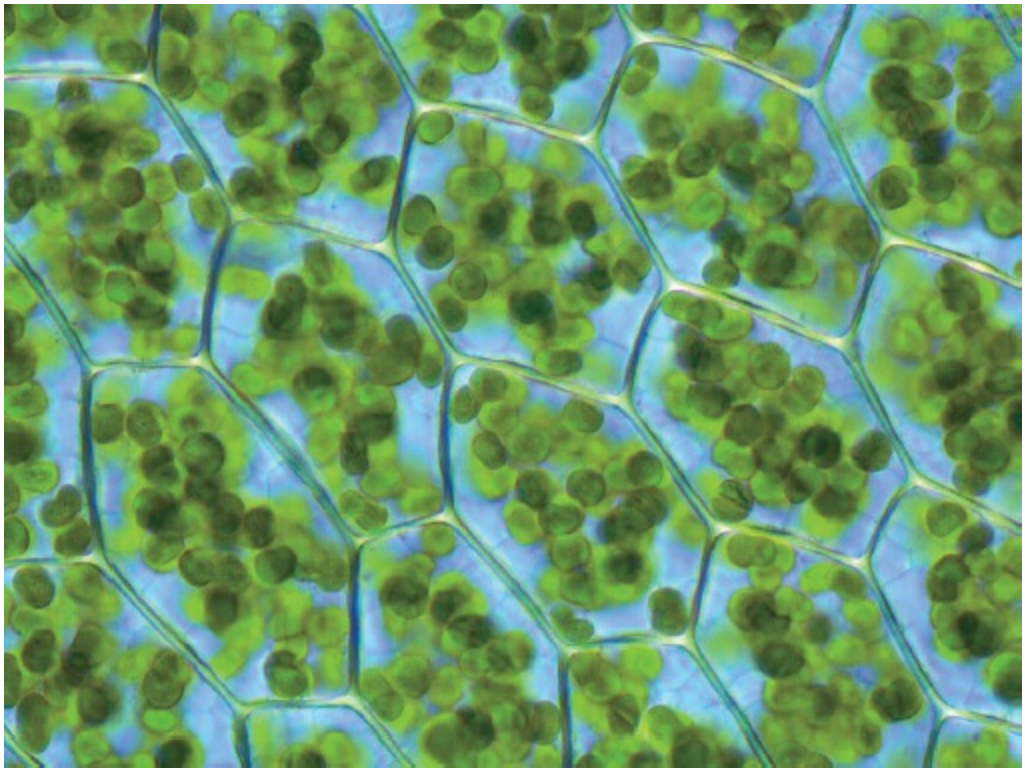
(e) O que esses resultados, em associação com os obtidos no primeiro experimento, lhe dizem sobre a natureza da mutação?

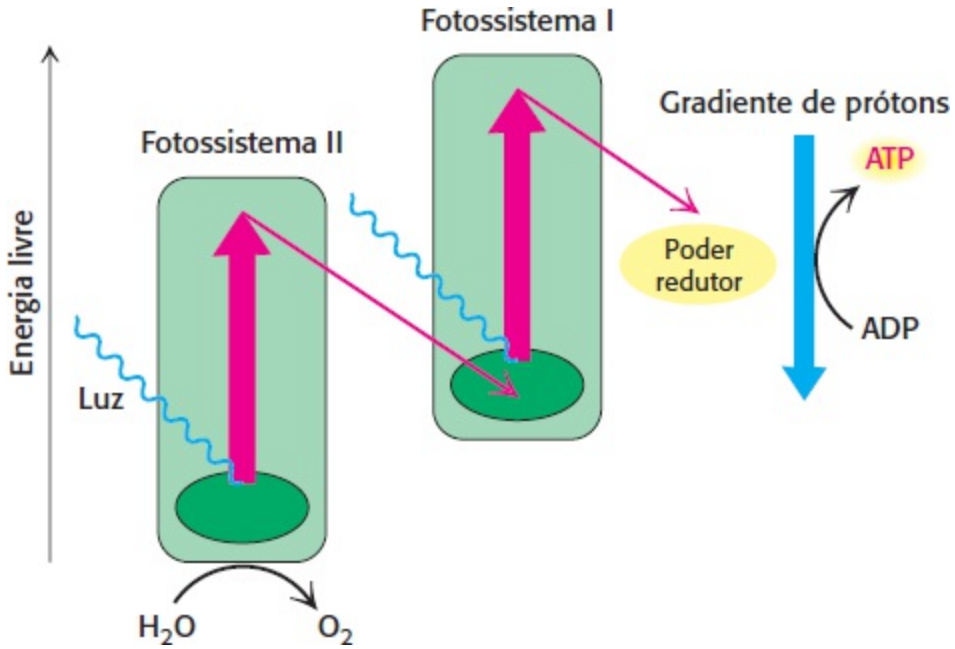
Questões sobre mecanismo

46. *Um indício referente à quiralidade*. ATPγS, um análogo lentamente hidrolisado de ATP, pode ser empregado para pesquisar o mecanismo das reações de transferência de fosforila. Foi sintetizado ATPγS quiral contendo ^{18}O em uma posição γ específica e ^{16}O em outro ponto da molécula. A hidrólise dessa molécula quiral pela ATP sintase em água enriquecida com ^{17}O produz [^{16}O,^{17}O,^{18}O]tiofosfato com a seguinte configuração absoluta. Em contrapartida, a hidrólise desse ATPγS quiral por uma ATPase bombeadora de cálcio da musculatura fornece tiofosfato da configuração oposta. Qual é a interpretação mais simples desses dados?



Fotorreações da Fotossíntese





Os cloroplastos (à esquerda) convertem a energia luminosa em energia química. Os elétrons de alta energia nos cloroplastos são transportados por dois fotossistemas (à direita). Nesse trajeto, que culmina na geração de poder redutor, ATP é sintetizado, de modo análogo, à síntese de ATP mitocondrial. Todavia, ao contrário do transporte mitocondrial de elétrons, os elétrons nos cloroplastos são energizados pela luz. [(Fotografia à esquerda, criação de Kristian Peters/GNU Free Documentation License.]

SUMÁRIO

19.1 A fotossíntese ocorre nos cloroplastos

19.2 A absorção de luz pela clorofila induz a transferência de elétrons

19.3 Dois fotossistemas geram um gradiente de prótons e NADPH na fotossíntese oxigênica

19.4 Um gradiente de prótons através da membrana tilacoide impulsiona a síntese de ATP

19.5 Pigmentos acessórios direcionam a energia para os centros de reação

19.6 A capacidade de converter a luz em energia química é antiga

No planeta Terra existem organismos que conseguem coletar a energia eletromagnética do espectro visível e convertê-la em energia química. As plantas de coloração verde são os mais óbvios desses organismos; contudo, 60% dessa conversão é realizada por algas e bactérias. Essa transformação é, talvez, a mais importante de todas as transformações energéticas que encontraremos em nosso estudo de bioquímica. Sem essa transformação, a vida na Terra como a conhecemos, simplesmente não poderia existir.

O processo de converter radiação eletromagnética em energia química é denominado *fotossíntese*, na qual a energia luminosa é usada para converter dióxido de carbono e água em carboidratos e oxigênio.

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Luz}} (CH_2O) + O_2$$

Nessa equação, CH_2O representa carboidrato, basicamente sacarose e amido. Esses carboidratos não apenas fornecem energia necessária para os processos biológicos, mas também fornecem as moléculas de carbono necessárias para a produção de uma ampla gama de biomoléculas. Os organismos fotossintéticos são denominados *autótrofos* (literalmente, capazes de produzir o próprio alimento) porque conseguem sintetizar matéria energética química, como, por exemplo, glicose a partir do dióxido de carbono e água, por utilização da energia luminosa como fonte de energia e, depois, recuperar parte dessa energia a partir da glicose sintetizada pela via glicolítica e pelo metabolismo aeróbico. Os organismos que obtêm energia somente de matéria energética química são denominados *heterótrofos*. Os heterótrofos dependem, em última instância, dos autótrofos para obter energia.

A fotossíntese pode ser dividida em duas fases: a fase clara ou luminosa (que depende da energia luminosa) e a fase escura. Na fase clara, a energia luminosa é transformada em duas formas de energia bioquímica que já conhecemos: poder redutor e ATP. Os produtos da fase clara ou luminosa são, então, usados na fase escura para impulsionar a redução de CO_2 e sua conversão em glicose e outros açúcares. As reações da fase escura também são denominadas ciclo de Calvin ou reações independentes de luz e serão descritas no Capítulo 20.

A fotossíntese converte energia luminosa em energia química

As reações da fase clara da fotossíntese assemelham-se muito aos eventos da fosforilação oxidativa. Nos Capítulos 17 e 18 aprendemos que a respiração celular consiste na oxidação da glicose a CO_2 com a redução de O_2 a água, um processo que gera ATP. Na fotossíntese esse processo tem de ser

revertido, ou seja, há redução do CO_2 e oxidação de H_2O para sintetizar glicose.

$$\text{Energia} + 6\,H_2O + 6\,CO_2 \xrightarrow{\text{Fotossíntese}} C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2$$

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \xrightarrow[\text{celular}]{\text{Respiração}} 6\,O_2 + 6\,H_2O + \text{energia}$$

Embora os processos de respiração e fotossíntese sejam quimicamente opostos, os princípios bioquímicos responsáveis pelos dois processos são quase idênticos. O elemento essencial desses dois processos é a geração de elétrons de alta energia. O ciclo do ácido cítrico oxida fontes de carbono em CO_2 com o propósito de gerar elétrons de alta energia. O fluxo desses elétrons de alta energia ao longo de uma cadeia de transporte de elétrons gera uma força próton-motriz. Essa força próton-motriz é, então, transduzida pela ATP sintase para formar ATP. Para sintetizar glicose a partir de CO_2, os elétrons de alta energia são necessários para dois propósitos: (1) proporcionar poder redutor na forma de NADPH para reduzir CO_2 e (2) gerar ATP para potencializar a redução. Como os elétrons de alta energia podem ser gerados sem uma fonte de energia química? *A fotossíntese usa energia proveniente da luz para impulsionar elétrons de um estado de baixa energia para um estado de alta energia*. No estado de alta energia (instável), as moléculas próximas conseguem se esconder com os elétrons excitados. Esses elétrons são utilizados para produzir poder redutor e são utilizados indiretamente por meio de uma cadeia de transporte de elétrons e de uma força próton-motriz transmembrana, que subsequentemente impulsiona a síntese de ATP. As reações potencializadas pela luz solar são denominadas *reações de fase clara ou luminosa* (Figura 19.1).

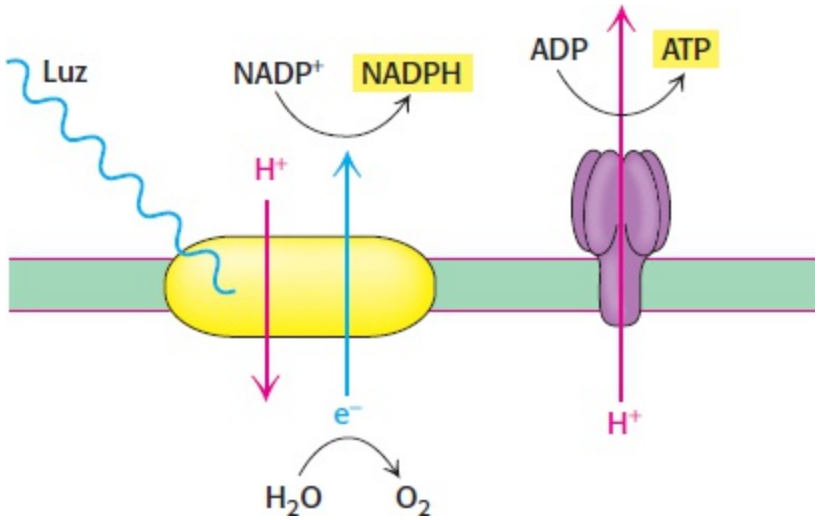


Figura 19.1 Reações de fase clara ou luminosa da fotossíntese. A luz é absorvida e a energia é empregada para impulsionar elétrons da água para gerar NADPH e para impulsionar prótons através de uma membrana. Esses prótons retornam através da ATP sintase para produzir ATP.

Rendimento fotossintético

"Se o rendimento anual da fotossíntese fosse amontoado na forma de cana-deaçúcar, resultaria em uma pilha com mais de 3 km de altura e com uma base de 69 km^2."

–G.E. Fogge

Se toda essa cana-de-açúcar fosse convertida em cubos de açúcar (1,27 cm em cada lado) e esses fossem armazenados enfileirados, os cubos de açúcar se estenderiam por $2{,}6 \times 10^{10}$ km) ou até o planeta Plutão.

A fotossíntese nas plantas verdes é mediada por dois tipos de reações luminosas. O fotossistema I gera poder redutor na forma de NADPH; contudo, no processo perde elétrons. O fotossistema II oxida água e transfere os elétrons para repor os elétrons perdidos pelo fotossistema I. Um subproduto dessas reações é o O_2. O fluxo de elétrons do fotossistema II para o fotossistema I gera o gradiente de prótons transmembrana, incrementado pelos prótons liberados pela oxidação da água, que impulsiona a síntese de ATP. De acordo com a semelhança de seus princípios de operação, os dois processos ocorrem em organelas com dupla membrana: mitocôndrias para a respiração celular e cloroplastos para a fotossíntese.

Catástrofe fotossintética

Se não houvesse mais fotossíntese no nosso planeta, todas as formas superiores de vida se extinguiriam em aproximadamente 25 anos. Uma versão mais branda dessa catástrofe encerrou o período Cretáceo há 65,1 milhões de anos quando um asteroide de grandes dimensões atingiu a península de Yucatan no México. Foi lançada para a atmosfera uma quantidade tão grande de poeira que a capacidade de fotossíntese foi substancialmente diminuída. Aparentemente isso resultou no desaparecimento dos dinossauros e possibilitou a ascensão dos mamíferos.

19.1 A fotossíntese ocorre nos cloroplastos

A fotossíntese, a maneira de converter luz em energia química, ocorre em organelas denominadas *cloroplastos*. Os cloroplastos têm, tipicamente, 5 μm de comprimento. Como uma mitocôndria, um cloroplasto tem uma membrana externa e uma membrana interna, com um espaço intermembrana de permeio (Figura 19.2). A membrana interna circunda um espaço denominado *estroma*, que é o local das reações de fase escura da fotossíntese (Seção 20.1). No estroma existem estruturas membranosas denominadas *tilacoides*, que são discos ou sacos achatados. Os sacos tilacoides são "empilhados" e formam um *granum*. *Grana* diferentes são conectados por regiões de membrana tilacoide, denominadas *lamelas do estroma* (Figura 19.3). As membranas tilacoides separam o espaço tilacoide do espaço estromal. Desse modo, os cloroplastos apresentam três membranas diferentes (*membranas externa, interna e tilacoide*) e três espaços separados (*espaços intermembrana, estromal e tilacoide*). Nos cloroplastos em desenvolvimento, os tilacoides surgem de brotamentos da membrana interna e, portanto, são análogos às cristas mitocondriais. Da mesma maneira que as cristas mitocondriais, são o local das reações acopladas de oxidação-redução das reações de fase clara que geram a força próton-motriz.

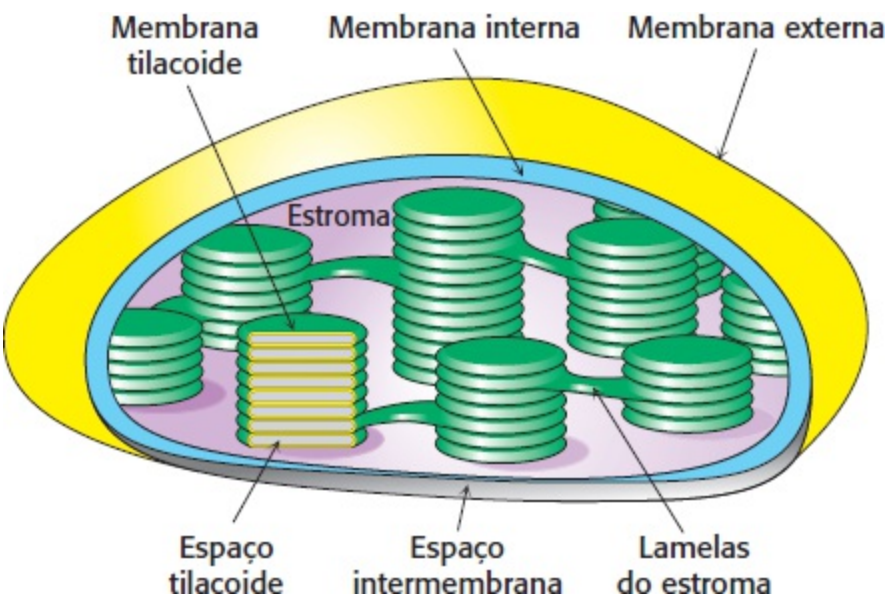


Figura 19.2 Diagrama de um cloroplasto.

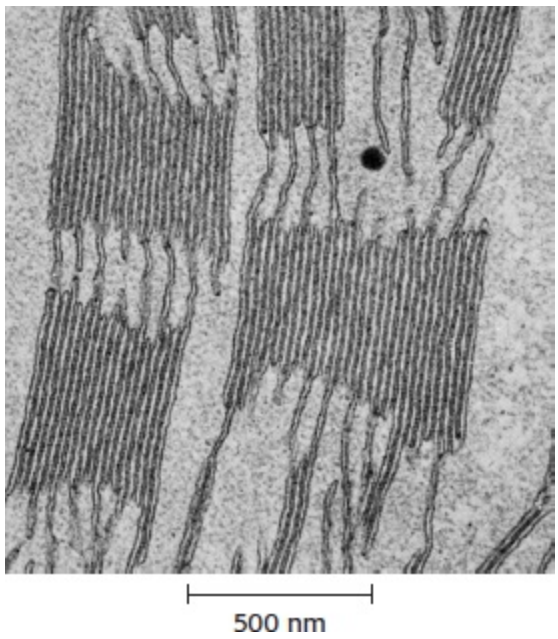


Figura 19.3 Micrografia eletrônica de um cloroplasto de folha de espinafre. As membranas tilacoides agrupadas formam *grana*. [Cortesia do Dr. Kenneth Miller.]

Os eventos primários da fotossíntese ocorrem nas membranas tilacoides

As membranas tilacoides contêm o maquinário de transformação de energia: proteínas que coletam luz, centros de reação, cadeias de transporte de elétrons e ATP sintase. Essas membranas contêm quantidades quase iguais de lipídios e proteínas. A composição lipídica é extremamente característica: aproximadamente 40% dos lipídios totais são *galactolipídios* e 4% são *sulfolipídios*, enquanto apenas 10% são fosfolipídios. A membrana tilacoide e a membrana interna, como a membrana mitocondrial interna, são impermeáveis a maioria das moléculas e íons. A membrana externa de um cloroplasto, como a de uma mitocôndria, é extremamente permeável a pequenas moléculas e íons. O estroma contém as enzimas solúveis que utilizam NADPH e ATP sintetizados pelas membranas tilacoides para converter CO_2 em açúcar. As células das folhas de plantas contêm entre 1 e 100 cloroplastos, dependendo da espécie, do tipo de célula e das condições de crescimento.

Os cloroplastos originam-se de um evento endossimbiótico

Os cloroplastos contêm seu próprio DNA e o maquinário de replicação e expressão do mesmo. Todavia, os cloroplastos não são autônomos: eles também contêm muitas proteínas codificadas por DNA nuclear. Como se desenvolve a intrigante relação entre a célula e seus cloroplastos? Atualmente acreditamos que, de forma análoga à evolução das mitocôndrias (Seção 18.1), os cloroplastos resultam de eventos endossimbióticos nos quais um microrganismo fotossintético, mais provavelmente um ancestral de uma cianobactéria (Figura 19.4), foi engolfado por um hospedeiro eucariótico. As evidências sugerem que os cloroplastos em plantas superiores e em algas verdes provêm de um evento endossimbiótico isolado, enquanto os cloroplastos em algas vermelhas e marrons resultam de pelo menos um evento adicional.

Figura 19.4 Cianobactérias. Uma colônia da cianobactéria filamentosa fotossintética *Anabaena* é mostrada (ampliação de 450 ×). Acredita-se que ancestrais dessas bactérias evoluíram e se tornaram os cloroplastos atuais. [James W. Richardson/Visuals Unlimited.]

O genoma do cloroplasto é menor que o genoma de uma cianobactéria, contudo, apresentam características em comum. Ambos são circulares e apresentam um único local inicial para a replicação do DNA. Os genes do cloroplasto e da cianobactéria estão dispostos em *óperons* – sequências de genes funcionalmente correlatos sob controle comum (Capítulo 31). Durante a evolução, muitos dos genes do ancestral do cloroplasto foram transferidos para o núcleo da célula da planta ou, em alguns casos, foram totalmente perdidos, estabelecendo uma relação totalmente dependente.

19.2 A absorção de luz pela clorofila induz a transferência de elétrons

A retenção da energia luminosa é fundamental para a fotossíntese. O primeiro evento consiste na absorção da luz por uma molécula fotorreceptora. O fotorreceptor principal nos cloroplastos da maioria das plantas verdes é o pigmento *clorofila* a, um tetrapirrol substituído (Figura 19.5). Os quatro átomos nitrogênio dos pirróis são coordenados por um íon magnésio. Ao contrário das porfirinas (p.ex., heme), a clorofila apresenta um anel pirrólico reduzido e um anel adicional com cinco carbonos fundido a um dos anéis pirrólicos. Outra característica distintiva da clorofila é a presença de *fitol*, um álcool extremamente hidrofóbico com 20 carbonos, esterificado a uma cadeia lateral ácida.

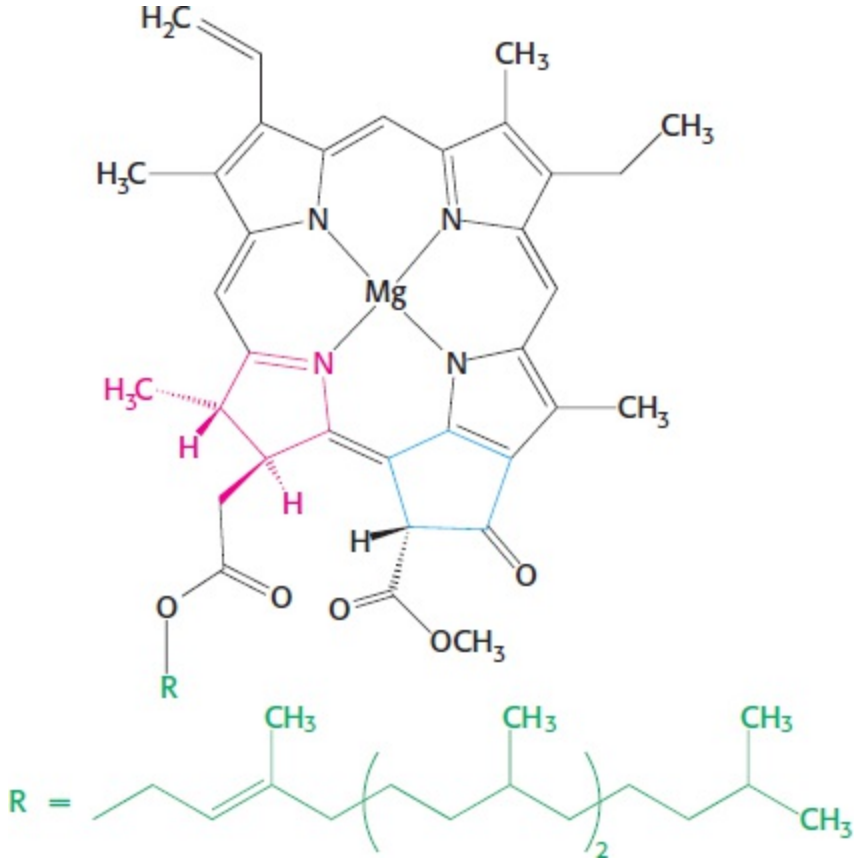


Figura 19.5 Clorofila. Como o heme, a clorofila *a* é um tetrapirrol cíclico. Um dos anéis pirrólicos (mostrado em vermelho) está reduzido, e um anel adicional com cinco carbonos (mostrado em azul) está fundido a outro anel pirrólico. Uma cadeia de fitol (mostrada em verde) está conectada por uma ligação éster. O íon magnésio liga-se ao centro da estrutura.

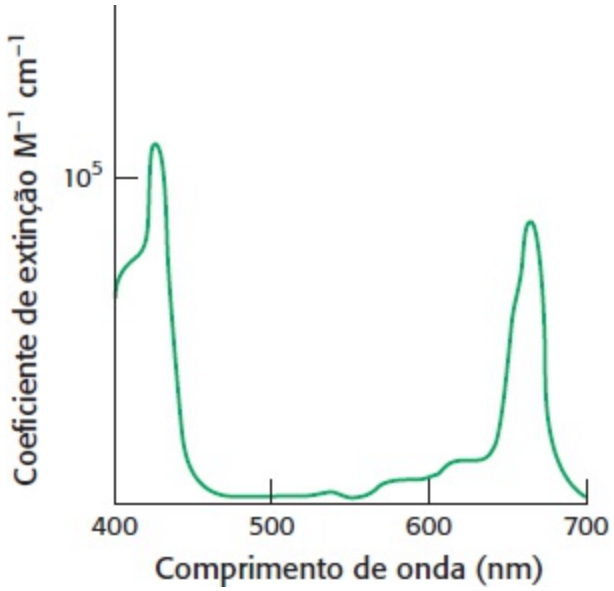


Figura 19.6 Absorção da luz pela clorofila *a*. A clorofila *a* absorve a luz visível de modo eficiente, de acordo com o coeficiente de extinção próximo a 10^5 M^{-1} cm^{-1}.

As clorofilas são fotorreceptores muito efetivos porque contêm redes de ligações duplas conjugadas – com alternância de ligações únicas e duplas. Esses compostos são denominados *polienos* conjugados. Nos polienos os elétrons não estão localizados em um núcleo atômico específico e, consequentemente, conseguem absorver mais rapidamente a energia luminosa. As clorofilas apresentam bandas de absorção muito potentes na região visível do espectro, no qual o débito solar que atinge o planeta Terra é máximo (Figura 19.6). O coeficiente de extinção molar

máximo (ε) da clorofila *a*, uma medida da capacidade de absorção de luz de uma substância, é superior a $10^5\ M^{-1}\ cm^{-1}$, um dos mais elevados entre compostos orgânicos.

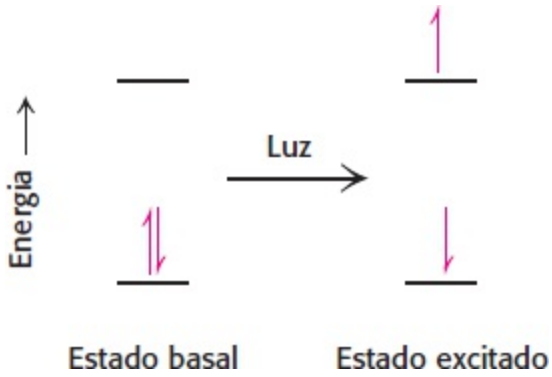


Figura 19.7 Absorção da luz. A absorção da luz resulta na excitação de um elétron, de seu estado basal para um nível de energia mais alto.

O que acontece quando a luz é absorvida por uma molécula de pigmento como a clorofila? A energia proveniente da luz excita um elétron a partir de seu estado basal para um nível energético excitado (Figura 19.7). Esse elétron de alta energia pode ter um de dois destinos. Na maioria dos compostos que absorvem luz, o elétron simplesmente retorna ao estado basal e a energia absorvida é convertida em calor. Todavia, se houver um aceptor de elétrons adequado na vizinhança, o elétron excitado consegue se mover da molécula inicial para o aceptor (Figura 19.8). Uma carga elétrica positiva se forma na molécula inicial, graças à perda de um elétron, e uma carga elétrica negativa se forma no aceptor, em decorrência do ganho de um elétron. Assim sendo, esse processo é denominado *separação fotoinduzida de carga elétrica*.

Nos cloroplastos, os locais nos quais ocorre a separação de carga elétrica em cada fotossistema é denominado *centro de reação*. O aparato fotossintético é disposto de modo a maximizar a separação fotoinduzida de carga elétrica e minimizar o retorno improdutivo do elétron ao seu nível basal. O elétron, extraído de seu local inicial pela absorção de luz, agora tem poder redutor: consegue reduzir outras moléculas com armazenamento da energia originalmente obtida da luz em formas químicas.

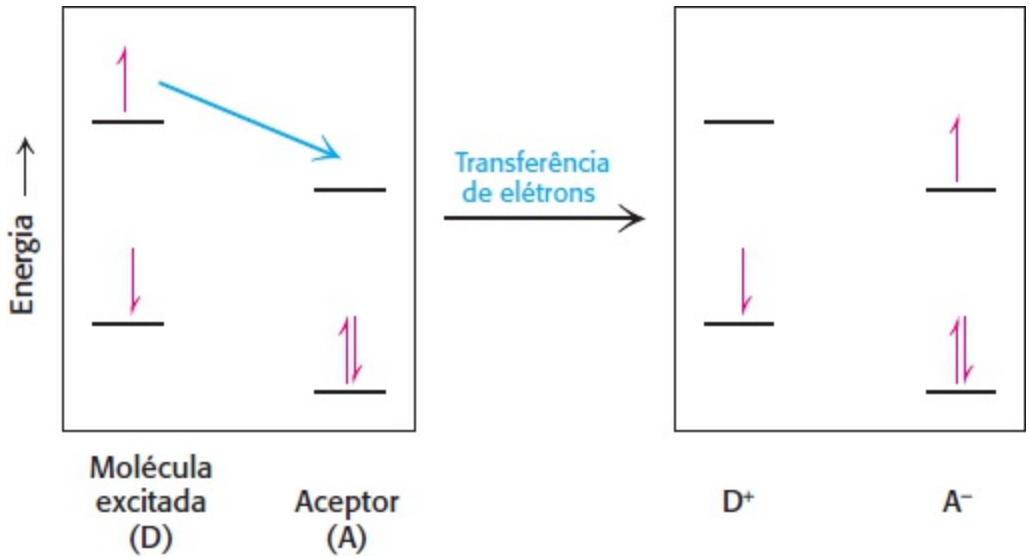


Figura 19.8 Separação fotoinduzida de carga elétrica. Se houver um aceptor de elétrons adequado nas proximidades, um elétron que foi deslocado para um nível de energia alto pela absorção de luz pode ser movido da molécula excitada para o aceptor.

Um par especial de clorofilas inicia a separação de carga elétrica

As bactérias fotossintéticas, como *Rhodopseudomonas viridis*, contêm um centro de reação fotossintética que foi resolvido à resolução atômica. O centro de reação dessas bactérias é constituído por quatro polipeptídios: L (31 kDa), M (36 kDa), Subunidades H (28 kDa) e C, um citocromo do tipo c com quatro hemes do tipo *c* (Figura 19.9). *As comparações de sequências e os estudos estruturais de baixa resolução revelaram que o centro de reação das bactérias é homólogo aos sistemas mais complexos de plantas.* Assim sendo, muitas das nossas observações do sistema bacteriano também se aplicam aos sistemas de plantas.

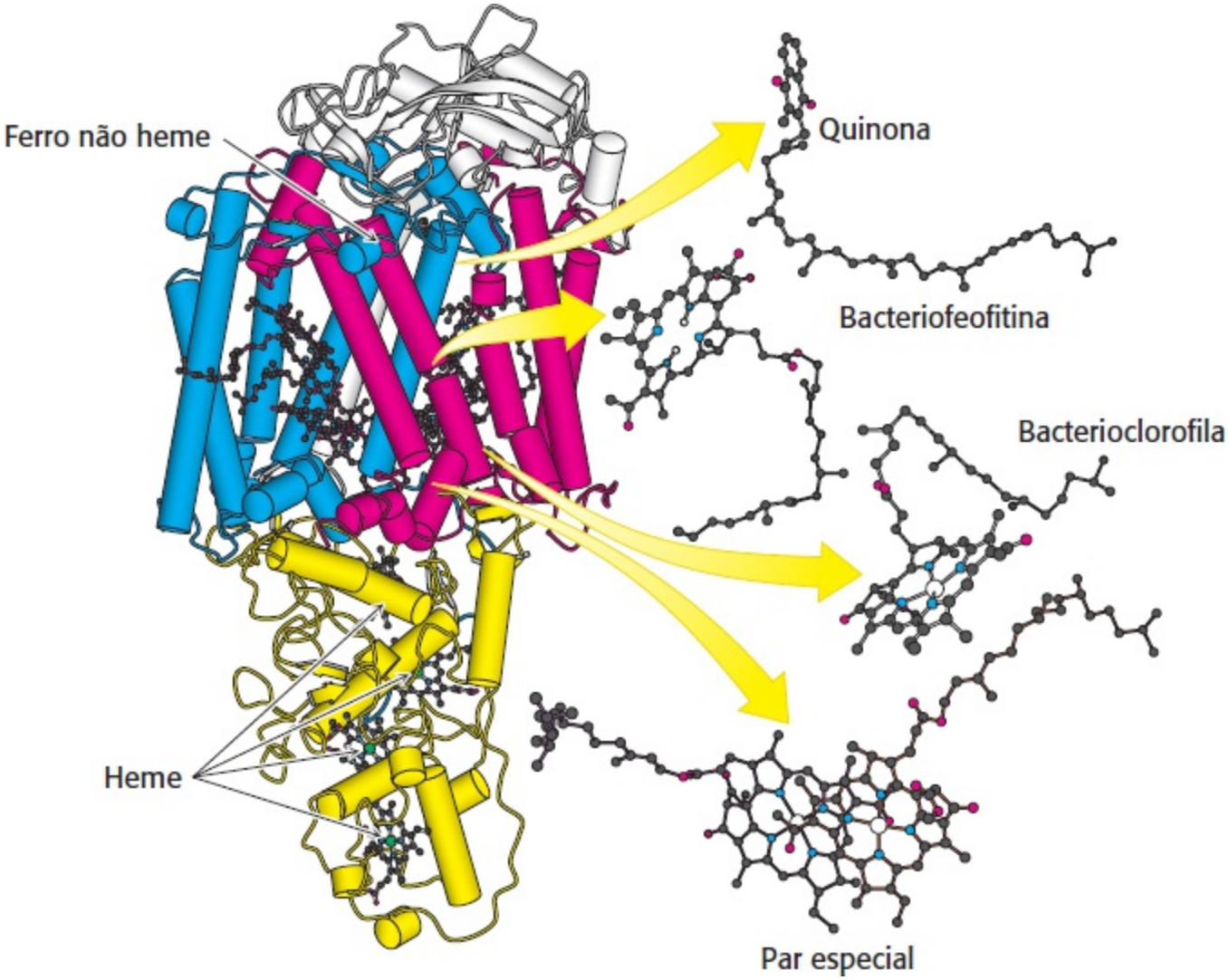
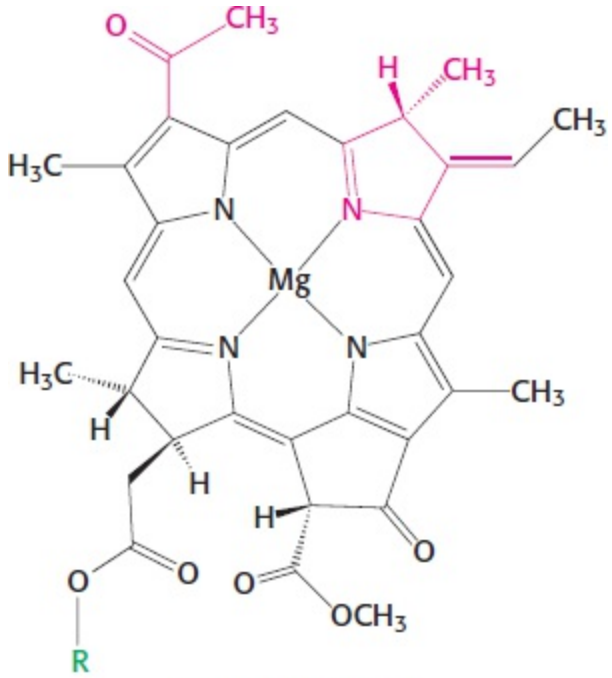
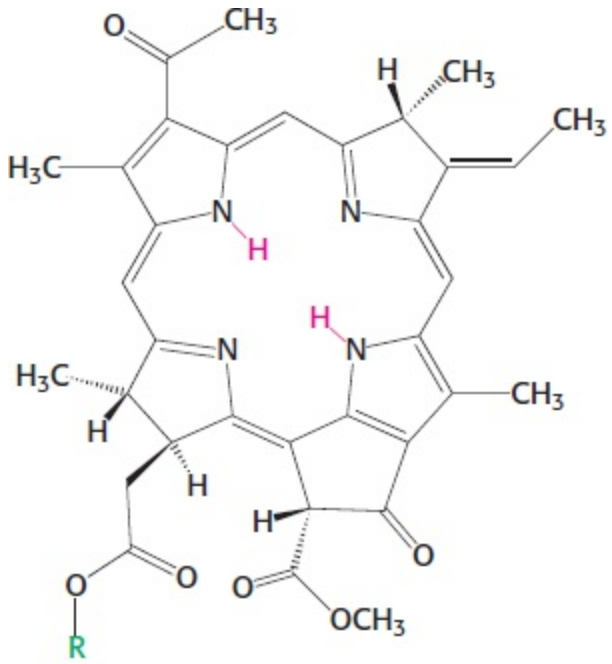


Figura 19.9 Centro de reação fotossintética bacteriano. O cerne do centro de reação da bactéria *Rhodopseudomonas viridis* é constituído por duas cadeias semelhantes: L (vermelho) e M (azul). Uma cadeia H (branca) e uma subunidade de citocromo (amarela) completam a estrutura. *Observe* que as subunidades L e M são constituídas principalmente por α-hélices que atravessam a membrana. Observe também que uma cadeia de grupos prostéticos carreadores de elétrons, começando com um par especial de bacterioclorofilas e terminando em uma quinona ligada, percorre toda a estrutura, desde a parte mais baixa até a parte mais alta nessa vista. [Desenhada a partir de 1PRC.pdb.]



Bacterioclorofila *b*
(BChl-*b*)



Bacteriofeofitina
(BPh)

As subunidades L e M formam um cerne estrutural e funcional do centro de reação fotossintético bacteriano (Figura 19.9). Cada uma dessas subunidades homólogas contém cinco hélices transmembranares, ao contrário da subunidade H, que tem apenas uma. A subunidade H está localizada no lado citoplasmático da membrana celular, enquanto a subunidade citocromo está localizada no lado exterior da membrana celular, que é denominado lado periplasmático porque "fica de frente para" o periplasma, o espaço entre a membrana celular e a parede celular. Quatro moléculas de bacterioclorofila *b* (BChl-*b*), duas moléculas de bacteriofeofitina *b* (BPh), duas quinonas (Q_A e Q_B) e um ferro ferroso estão associados às subunidades L e M.

As bacterioclorofilas são fotorreceptores semelhantes às clorofilas, exceto pela redução de um anel pirrólico adicional e outras diferenças mínimas que desviam sua absorção máxima para o

infravermelho próximo, para comprimentos de onda de até 1.000 nm. *Bacteriofeofitina* é o termo que descreve a bacterioclorofila que apresenta dois prótons em vez de um íon magnésio em seu centro.

A reação começa com a absorção de luz por uma dupla de moléculas BCh-*b* que estão localizadas próximo ao lado periplasmático da membrana no dímero L-M. As duas moléculas BCh-*b* são denominadas *par especial* por causa de sua participação essencial na fotossíntese. O par especial absorve a luz de forma máxima a 960 nm e, por causa disso, é frequentemente denominado *P960* (P para pigmento). Após absorver a luz, o par especial excitado ejeta um elétron, que é transferido por outra bacterioclorofila *b* (BChl-*b*) para uma bacteriofeofitina (Figura 19.10, etapas 1 e 2). Essa separação de carga elétrica inicial proporciona carga elétrica positiva para esse par especial ($P960^+$) e uma carga elétrica negativa para BPh. A ejeção de elétrons e a transferência ocorrem em menos de 10 picossegundos (10^{-11} s).

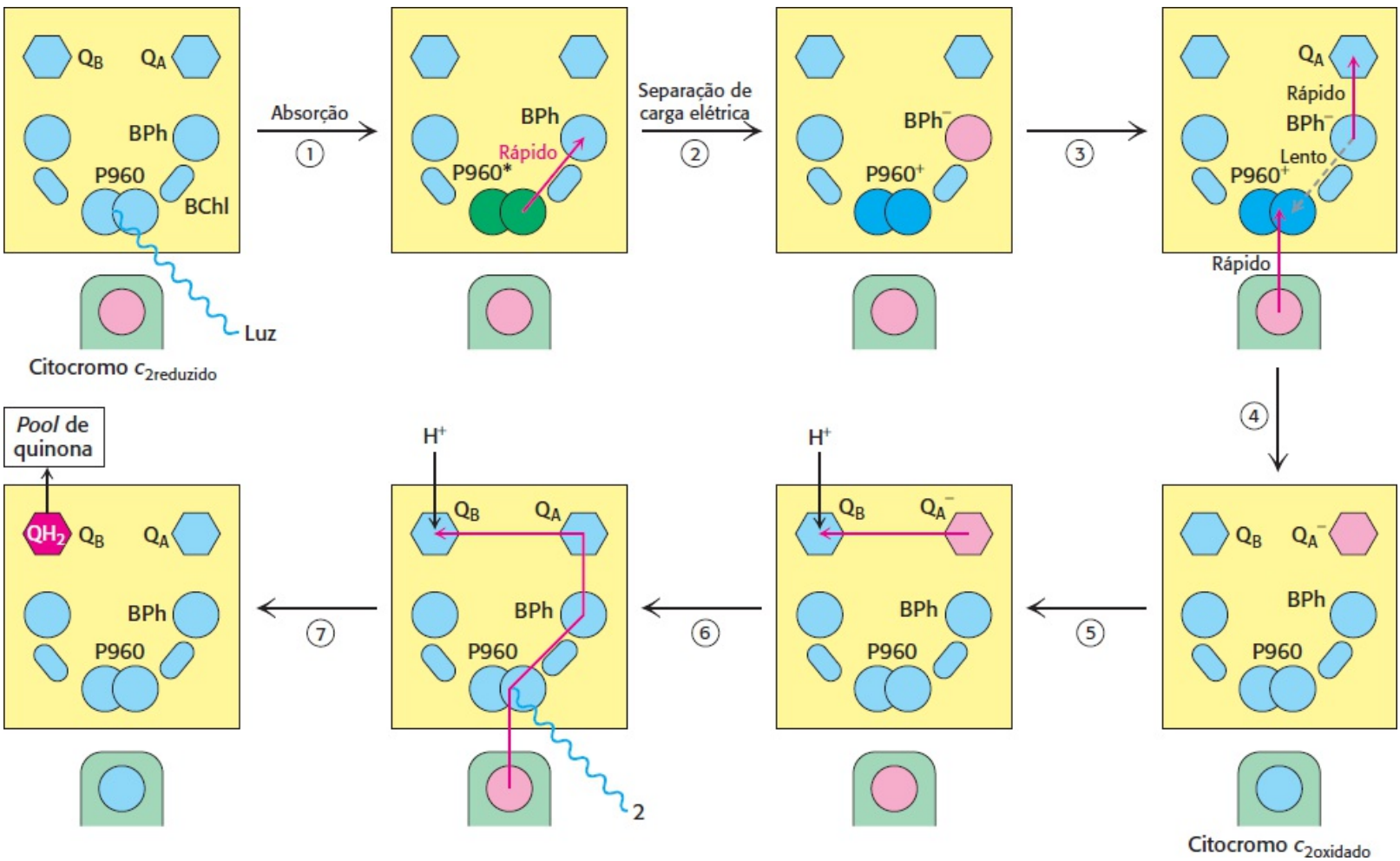


Figura 19.10 Cadeia de elétrons no centro de reação fotossintético bacteriano. A absorção de luz pelo par especial (P960) resulta em transferência rápida de um elétron deste sítio para uma bacteriofeofitina (BPh), criando uma separação fotoinduzida de carga elétrica (etapas 1 e 2). (O asterisco em P960 denota o estado excitado.) O possível retorno do elétron da feofitina para o par especial oxidado é suprimido por um "orifício" no par especial que está sendo preenchido por um elétron da subunidade citocromo e o elétron da feofitina está sendo transferido para uma quinona (Q_A) que está mais afastada do par especial (etapas 3 e 4). Q_A transfere o elétron para Q_B. A redução de uma quinona (Q_B) no lado citoplasmático da membrana resulta na captação de dois prótons do citoplasma (etapas 5 e 6). A quinona reduzida pode se mover para o *pool* de quinona na membrana (etapa 7).

Um aceptor de elétrons próximo, uma quinona com ligação forte (Q_A), capta rapidamente o elétron oriundo de BPh^- antes que o elétron tenha a chance de retornar para o especial P960. De Q_A, o elétron se move para uma quinona com ligação frouxa, Q_B. A absorção de um segundo fóton e o

movimento do segundo elétron a partir do par especial, desde a bacteriofeofitina até as quinonas, completa a redução de dois elétrons de Q_B de Q para QH_2. Como o sítio de ligação de Q_B é próximo ao lado citoplasmático da membrana, *dois prótons são captados do citoplasma, contribuindo para o desenvolvimento de um gradiente de prótons através da membrana celular* (Figura 19.10, etapas 5, 6 e 7).

Nos seus estados de alta energia, $P960^+$ e BPh^- poderiam sofrer recombinação da carga elétrica, ou seja, o elétron do BPh^- poderia se mover de volta para neutralizar a carga elétrica negativa no par especial. Seu retorno ao par especial desperdiçaria um valioso elétron de alta energia e simplesmente converteria a energia luminosa absorvida em calor. Como a recombinação da carga elétrica é impedida? Dois fatores na estrutura do centro de reação suprimiriam a recombinação de carga elétrica quase completamente (Figura 19.10, etapas 3 e 4). Primeiro, o aceptor de elétrons seguinte (Q_A) está a menos de 10 Å de BPh^- e, portanto, o elétron é rapidamente transferido para longe do par especial. Segundo, um dos hemes do citocromo está a menos de 10 Å do par especial, de modo que a carga elétrica positiva em P960 é neutralizada pela transferência de um elétron do citocromo reduzido.

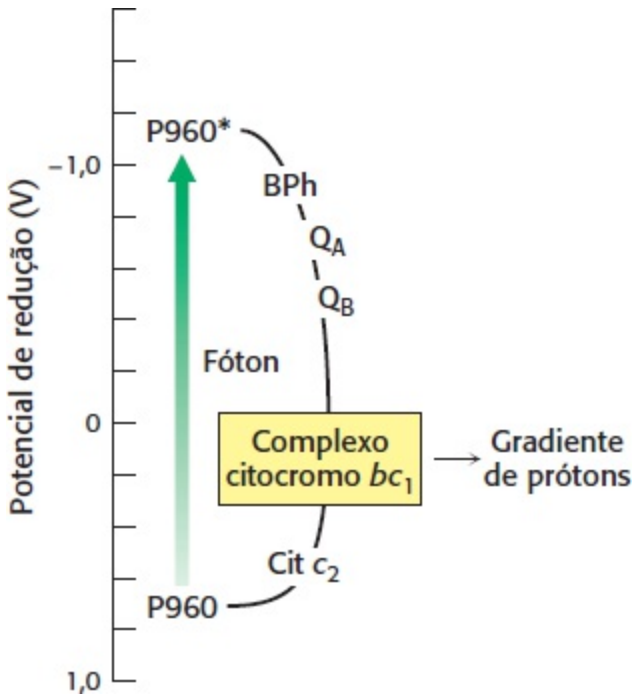


Figura 19.11 Fluxo cíclico de elétrons no centro de reação fotossintético bacteriano. Elétrons excitados do centro de reação P960 fluem através da bacteriofeofitina (BPh), uma dupla de moléculas de quinona (Q_A e Q_B), complexo citocromo bc_1 e, finalmente, através do citocromo c_2 para centro de reação. O complexo citocromo bc_1 bombeia prótons como resultado do fluxo de elétrons, que potencializa a formação de ATP.

O fluxo cíclico de elétrons reduz o citocromo do centro de reação

A subunidade citocromo do centro de reação precisa recuperar um elétron para completar o ciclo. Isso é feito por meio da retomada de dois elétrons da quinona reduzida (QH_2). QH_2 entra primeiro no *pool* de Q na membrana, onde é reoxidada a Q pelo complexo bc_1, que é homólogo ao complexo III da cadeia respiratória de transporte de elétrons. O complexo bc_1 transfere os elétrons de QH_2 para o citocromo c_2, uma proteína hidrossolúvel no periplasma, e, no processo, bombeia prótons para o espaço periplasmático. Os elétrons, agora no citocromo c_2, fluem para a subunidade citocromo do centro de reação. O fluxo de elétrons é, portanto, cíclico (Figura 19.11). O gradiente de prótons

gerado durante esse ciclo impulsiona a geração de ATP através da ação da ATP sintase.

19.3 Dois fotossistemas geram um gradiente de prótons e NADPH na fotossíntese oxigênica

A fotossíntese é mais complicada nas plantas verdes do que nas bactérias fotossintéticas. Nas plantas verdes, a fotossíntese depende da inter-relação de dois tipos de complexos fotossensíveis e ligados a membrana – o *fotossistema I* (PS I) e o *fotossistema II* (PS II), como se vê na Figura 19.12. Existem semelhanças na fotossíntese entre as plantas verdes e as bactérias fotossintéticas. Ambas necessitam de luz para energizar centros de reação constituídos por pares especiais, denominados P680 para o fotossistema I e P700 para o fotossistema II, e ambos transferem elétrons por meio de cadeias de transporte de elétrons. Todavia, nas plantas, o fluxo de elétrons não é cíclico e na maioria das circunstâncias evolui do fotossistema II para o fotossistema I.

O fotossistema I, que reage à luz em comprimentos de onda menores que 700 nm, utiliza os elétrons de alta energia provenientes da luz para criar poder redutor biossintético na forma de NADPH, um reagente versátil que impulsiona processos de biossíntese. Os elétrons para a criação de uma molécula de NADPH são captados de duas moléculas de água pelo fotossistema II, que reage a comprimentos de onda menores que 680 nm. Uma molécula de O_2 é criada como subproduto das ações do fotossistema II. Os elétrons vão do fotossistema II para o fotossistema I graças ao citocromo *bf*, um complexo ligado à membrana homólogo ao complexo III na fosforilação oxidativa. O citocromo *bf* gera um gradiente de prótons através da membrana tilacoide que impulsiona a formação de ATP. Assim, os dois fotossistemas cooperam para produzir NADPH e ATP.

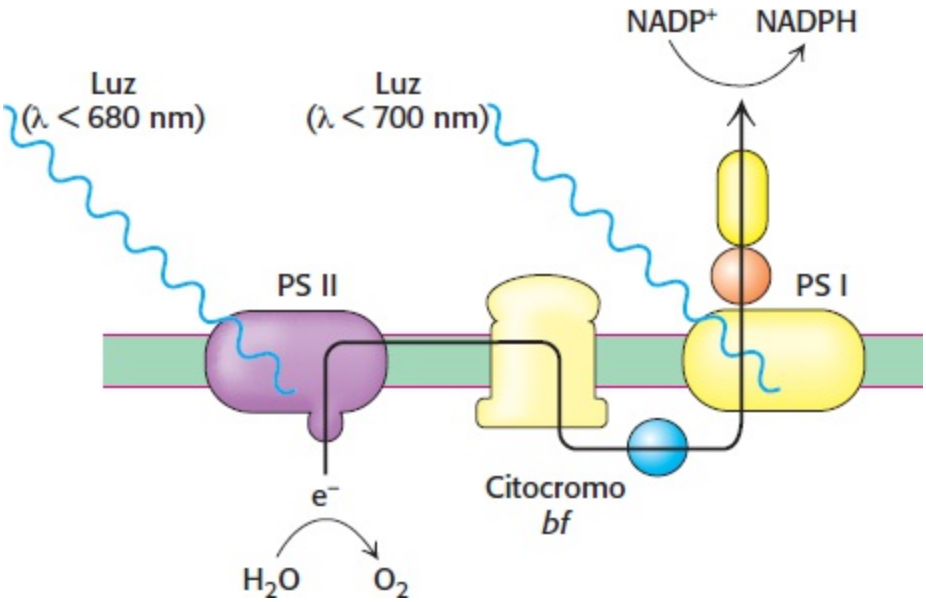


Figura 19.12 Dois fotossistemas. A absorção de fótons por dois fotossistemas diferentes (PS I e PS II) é necessária para completar o fluxo de elétrons da água para $NADP^+$.

O fotossistema II transfere elétrons da água para plastoquinona e gera um gradiente de prótons

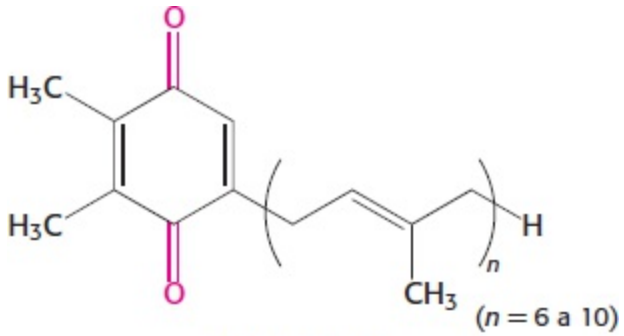
O fotossistema II, um enorme conjunto transmembrana com mais de 20 subunidades, catalisa a transferência fotoinduzida de elétrons da água para a plastoquinona. Esse aceptor de elétrons se

assemelha muito a ubiquinona, um componente da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. A plastoquinona cicla entre uma forma oxidada (Q) e uma forma reduzida (QH_2, plastoquinol). A reação catalisada pelo fotossistema II é

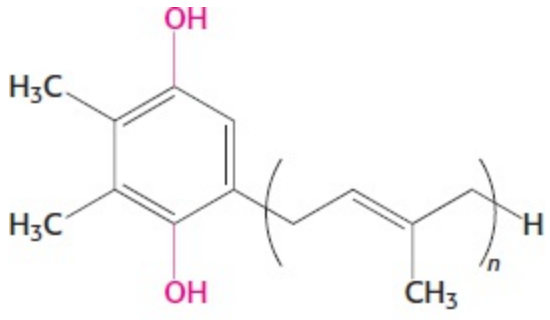
$$2\,Q + 2\,H_2O \xrightarrow{\text{Luz}} O_2 + 2\,QH_2$$

Os elétrons em QH_2 estão em um potencial redox mais elevado do que os elétrons na água. É preciso lembrar que, na fosforilação oxidativa, os elétrons fluem do ubiquinol para um aceptor, O_2, que está em um potencial *mais baixo*. O fotossistema II impulsiona uma reação "para cima", no sentido termodinâmico, ao utilizar a energia livre da luz.

Essa reação é semelhante àquela reação catalisada pelo sistema bacteriano na qual uma quinona é convertida de sua forma oxidada para sua forma reduzida. O fotossistema II é razoavelmente semelhante ao centro de reação das bactérias (Figura 19.13). O cerne do fotossistema é formado por D1 e D2, um par de subunidades semelhantes com 32 kDa que atravessam a membrana tilacoide. Essas subunidades são análogas às cadeias L e M do centro de reação das bactérias. Ao contrário do sistema bacteriano, o fotossistema II contém numerosas subunidades adicionais que ligam mais de 30 moléculas de clorofila e aumentam a eficiência com a qual a luz é absorvida e transferida para o centro de reação (Seção 19.5).



Plastoquinona
(forma oxidada, Q)



Plastoquinol
(forma reduzida, QH_2)

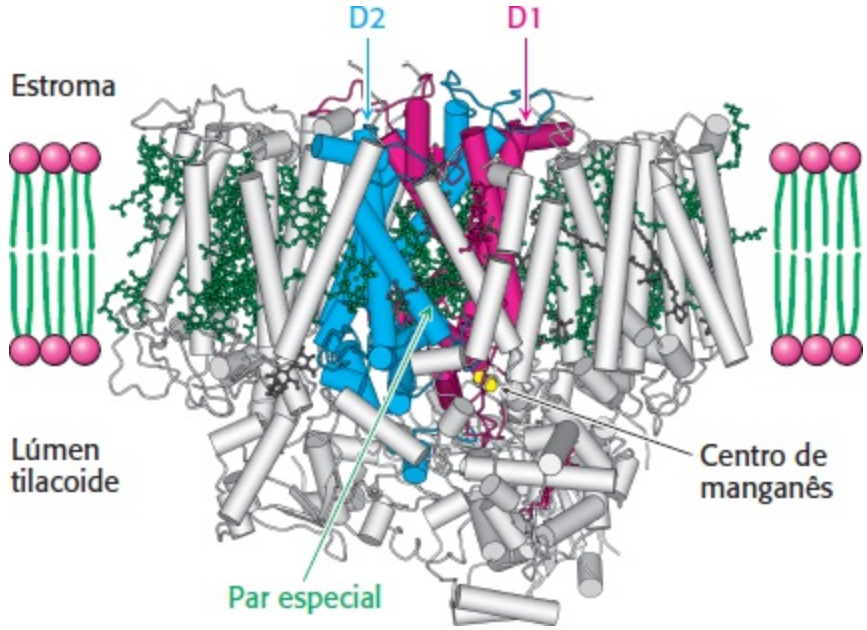


Figura 19.13 Estrutura do fotossistema II. As subunidades D1 e D2 são mostradas em vermelho e azul, respectivamente, e as numerosas moléculas de clorofila ligadas são mostradas em verde. Observe que o par especial e o centro de manganês (o local de evolução do oxigênio) estão voltados para o lado luminal tilacoide da membrana. [Desenhada a partir de 1S5L.pdb.]

A fotoquímica do fotossistema II começa com a excitação de um par especial de moléculas de clorofila que estão ligadas pelas subunidades D1 e D2 (Figura 19.14). Como as moléculas de clorofila *a* do par especial absorvem luz a 680 nm, o par especial é frequentemente denominado *P680*. Na excitação, o P680 transfere rapidamente um elétron para a feofitina próxima. A partir daí, o elétrons é transferido primeiro para uma plastoquinona firmemente ligada no sítio Q_A e, depois, para uma plastoquinona móvel no sítio Q_B. Esse fluxo de elétrons é inteiramente análogo ao que ocorre no sistema bacteriano. Com a chegada de um segundo elétron e a captação de dois prótons, a energia de dois fótons foi segura e eficientemente armazenada no potencial redutor de QH_2.

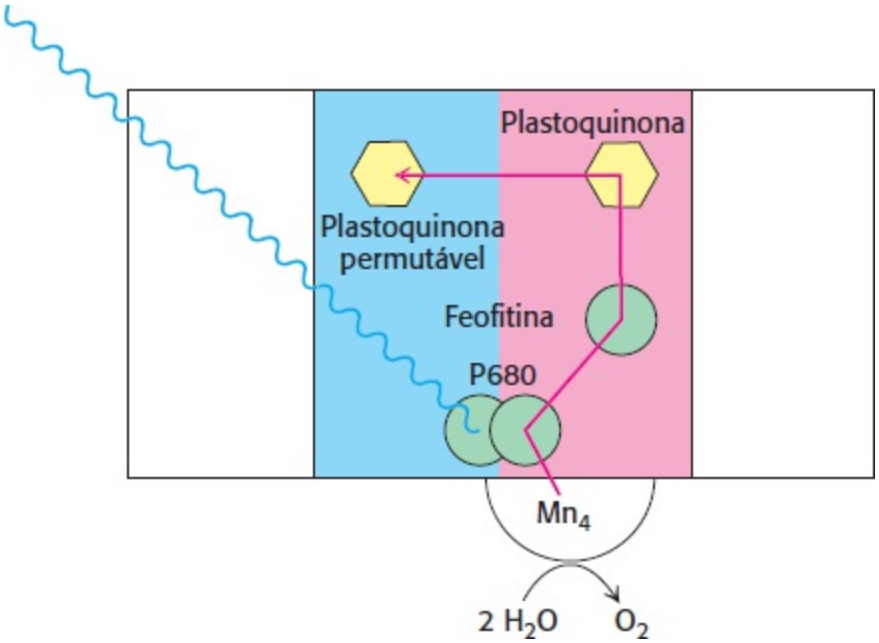


Figura 19.14 Fluxo de elétrons através do fotossistema II. A absorção de luz induz a transferência de elétrons de P680 por uma via de transferência de elétrons para uma plastoquinona permutável. A carga elétrica positiva em P680 é neutralizada pelo fluxo de elétrons a partir das moléculas de água ligadas no centro de manganês.

A principal diferença entre o sistema bacteriano e o fotossistema II é a fonte dos elétrons que são utilizados para neutralizar a carga elétrica positiva formada no par especial. *$P680^+$, um oxidante muito potente, extrai elétrons das moléculas de água ligadas no centro de manganês.* A estrutura desse centro inclui um íon de cálcio e quatro íons de manganês. Aparentemente o manganês foi selecionado para esse papel ao longo da evolução por causa de sua capacidade de existir em múltiplos estados de oxidação (Mn^{2+}, Mn^{3+}, Mn^{4+}, Mn^{5+}) e formar ligações fortes com espécies contendo oxigênio. O *centro de manganês*, em sua forma reduzida, oxida duas moléculas de água para formar uma única molécula de oxigênio. A cada vez que a absorbância de um fóton retira um elétron de P680, o par especial com carga elétrica positiva extrai um elétron do centro de manganês (Figura 19.15). Todavia, os elétrons não vêm diretamente dos íons de manganês. Um resíduo de tirosina (frequentemente designado Z) da subunidade D1 no fotossistema II é o doador de elétrons imediato, formando um radical tirosina. O radical tirosina remove elétrons dos íons manganês, que por sua vez retiram elétrons da água para formar O_2 e H^+. Quatro fótons têm de ser absorvidos para extrair quatro elétrons de uma molécula de água (Figura 19.16). Os quatro elétrons coletados da água são usados para reduzir duas moléculas de Q a QH_2.

Figura 19.15 Quatro fótons são necessários para gerar uma molécula de oxigênio. Quando os cloroplastos adaptados ao escuro são expostos a um breve clarão, um elétron passa através do fotossistema II. O monitoramento do O_2 liberado após cada clarão revela que quatro clarões são necessários para gerar cada molécula de O_2. Os picos na liberação de O_2 são após o 3º, o 7º e o 11º clarões porque os cloroplastos adaptados ao escuro iniciam no estado S_1, ou seja, o estado reduzido de um elétron.

A evolução do oxigênio é evidente pela geração de bolhas na planta aquática *Elodea*. [Colin Milkins/Oxford Scientific Films/Photolibrary.]

O fotossistema II atravessa a membrana tilacoide de tal modo que o local da redução da quinona fica no lado estromal, enquanto o centro de manganês, portanto o local de oxidação da água, está localizado no lúmen tilacoide. Assim sendo, os dois prótons que são captados com a redução de Q a QH_2 provêm do estroma e os quatro prótons que são liberados durante a oxidação da água são liberados para o lúmen. Essa distribuição de prótons gera um gradiente de prótons através da membrana tilacoide caracterizado por um excesso de prótons no lúmen tilacoide em comparação com o estroma (Figura 19.17).

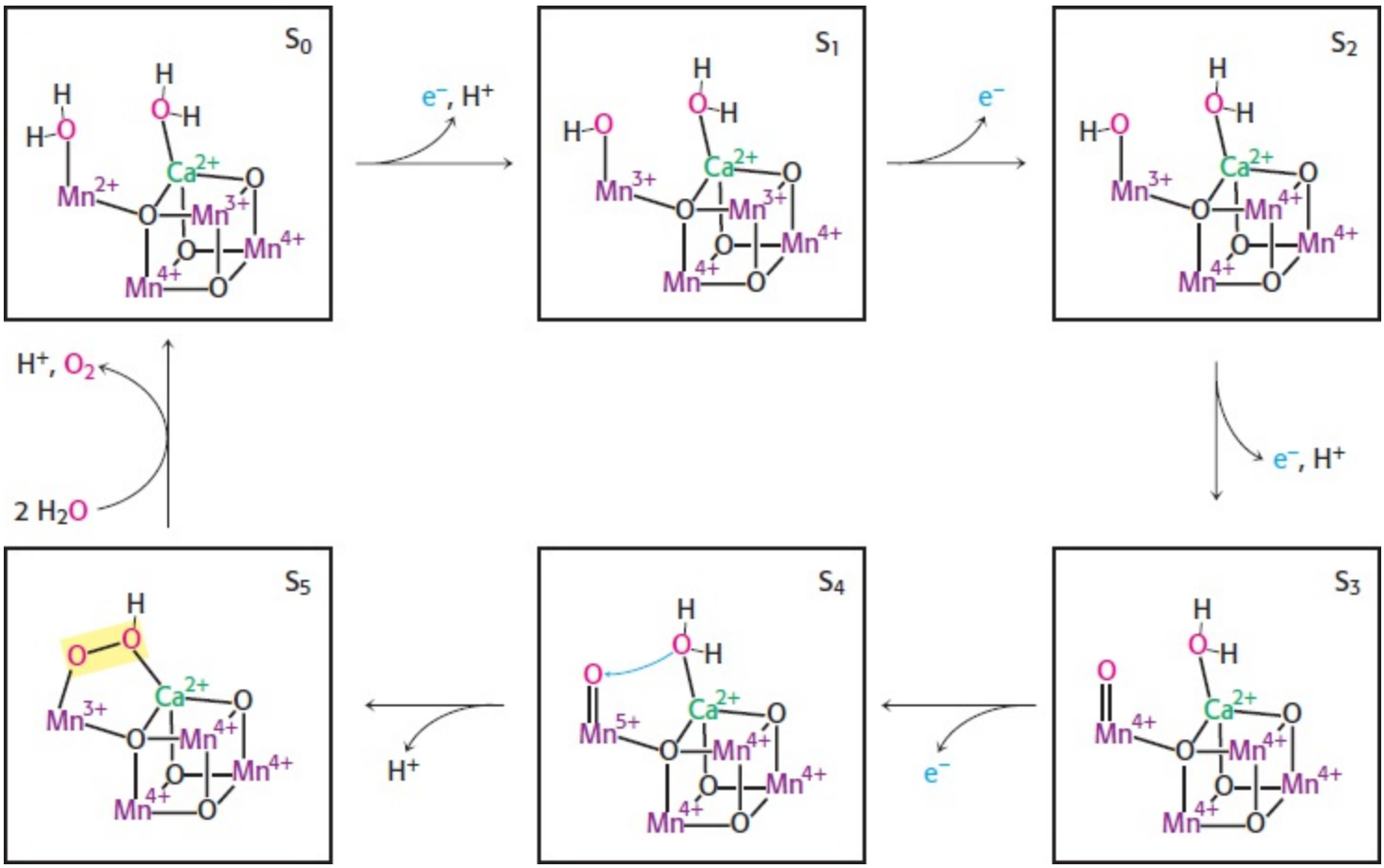


Figura 19.16 Esquema plausível para a evolução de oxigênio a partir do centro de manganês. Aqui é mostrada a estrutura interna deduzida do centro de manganês com quatro íons manganês e um íon cálcio, embora muitos ligantes adicionais não sejam mostrados (para simplificar). O centro é oxidado, um elétron por vez, até que duas moléculas de H_2O ligadas sejam conectadas para formar uma molécula de O_2, que é então liberada do centro. Um resíduo de tirosina (não mostrado) participa nas etapas de transferência acoplada de prótons e elétrons. As estruturas são designadas S_0-S_4 para indicar o número de elétrons que foram retirados.

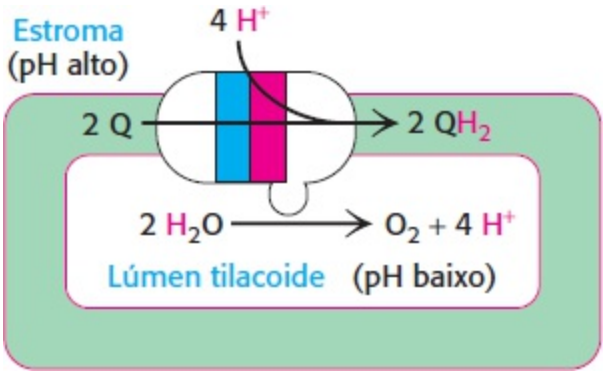


Figura 19.17 Sentido do gradiente de prótons. O fotossistema II libera prótons para o lúmen tilacoide e capta prótons do estroma. O resultado é um gradiente de pH através da membrana tilacoide com excesso de prótons (pH baixo) dentro.

O citocromo *bf* conecta o fotossistema II ao fotossistema I

Os elétrons fluem do fotossistema II para o fotossistema I através do complexo do citocromo *bf*. Esse complexo catalisa a transferência de elétrons do plastoquinol (QH_2) para a plastocianina (Pc), uma pequena metaloproteína (cobre) solúvel no lúmen tilacoide.

$$QH_2 + 2\ Pc\ (Cu^{2+}) \rightarrow Q + 2\ Pc\ (Cu^{+}) + 2\ H^{+}_{\text{lúmen tilacoide}}$$

Os dois prótons provenientes do plastoquinol são liberados para o lúmen tilacoide. Essa reação

lembra aquela reação catalisada pelo complexo III na fosforilação oxidativa, e a maioria dos componentes do complexo do citocromo *bf* são homólogos aos do complexo III. O complexo do citocromo *bf* inclui quatro subunidades: um citocromo com 23 kDa e dois hemes do tipo *b*, uma proteína Fe-S do tipo Rieske com 20 kDa, um citocromo *f* com 33 kDa e um citocromo do tipo c, e uma cadeia com 17 kDa.

Esse complexo catalisa a reação por meio do ciclo Q (ver Figura 18.12). Na primeira metade do ciclo Q, o plastoquinol (QH_2) é oxidado a plastoquinona (Q), um elétron por vez. Os elétrons do plastoquinol fluem através da proteína Fe-S para converter plastocianina oxidada (Pc) a sua forma reduzida.

Na segunda metade do ciclo Q, o citocromo *bf* reduz uma molécula de plastoquinona do *pool* de Q a plastoquinol, captando dois prótons de um lado da membrana, e depois reoxida o plastoquinol para liberar esses prótons do outro lado. A enzima é orientada de modo que os prótons sejam liberados para o lúmen tilacoide e captados do estroma, contribuindo ainda mais para o gradiente de prótons através da membrana tilacoide (Figura 19.18).

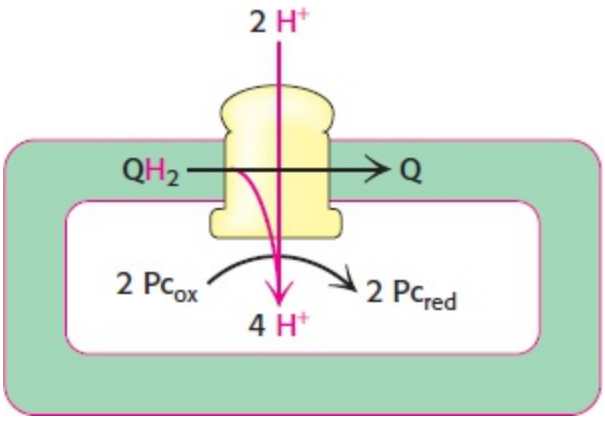


Figura 19.18 Contribuição do citocromo *bf* para o gradiente de prótons. O complexo do citocromo *bf* oxida QH_2 a Q através do ciclo Q. Quatro prótons são liberados para o lúmen tilacoide a cada ciclo.

O fotossistema I usa energia luminosa para gerar ferredoxina reduzida, um redutor potente

O estágio final das reações de fase clara é catalisado pelo fotossistema I, um complexo transmembranar constituído por aproximadamente 14 cadeias polipeptídicas e múltiplas proteínas e cofatores associados (Figura 19.19). O cerne desse sistema é um par de subunidades semelhantes, psaA (83 kDa) e psaB (82 kDa). Essas subunidades são bem maiores que as subunidades do cerne do fotossistema II e do centro de reação das bactérias. Não obstante, eles parecem ser homólogos. Os 40% terminais de cada subunidades são semelhantes a uma subunidade correspondente do fotossistema II. Um par especial de moléculas de clorofila *a* está localizado no centro da estrutura e absorve luz ao máximo a 700 nm. Esse centro, denominado P700, inicia a separação fotoinduzida de carga elétrica (Figura 19.20). O elétron se desloca de P700 através da clorofila no sítio A_0 e da quinona no sítio A_1 para um conjunto de agregados 4Fe-4S. A etapa seguinte consiste na transferência do elétron para a ferredoxina (Fd), uma proteína solúvel que contém um agregado 2Fe-2S coordenado com quatro resíduos cisteína (Figura 19.21). A ferredoxina transfere elétrons para $NADP^+$. Enquanto isso, $P700^+$ captura um elétron proveniente da plastocianina reduzida para voltar ao estado P700 e, assim, poder ser excitado de novo. Portanto, toda a reação catalisada pelo

fotossistema I é uma reação simples de oxidação-redução de um elétron.

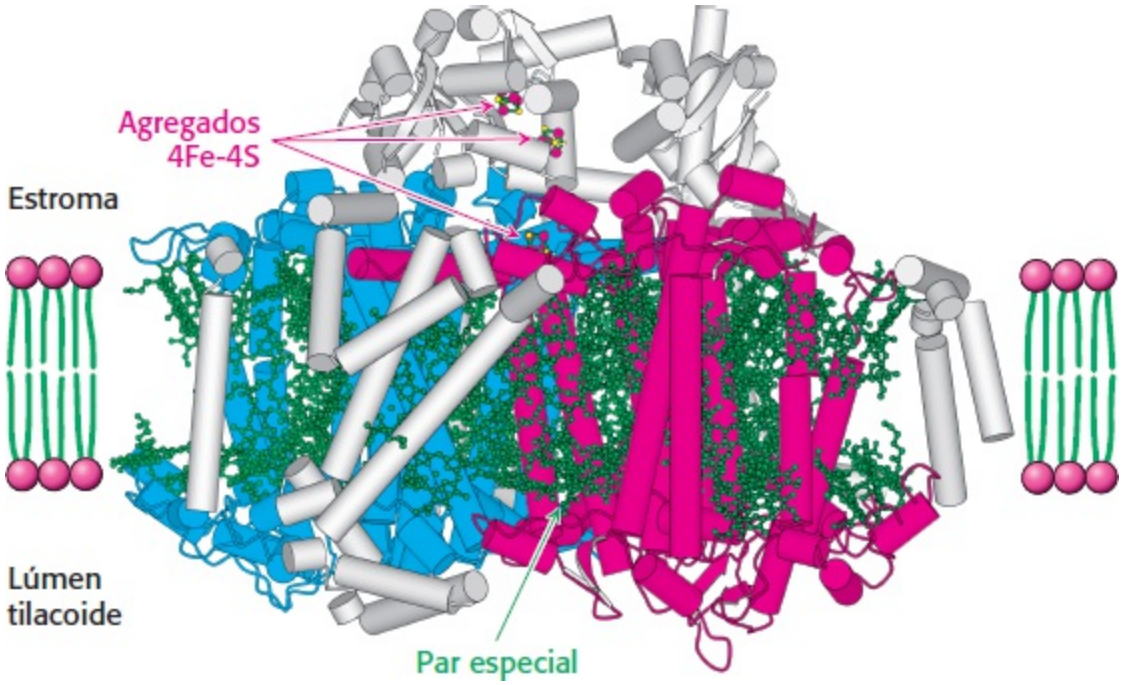


Figura 19.19 Estrutura do fotossistema I. As subunidades psaA e psaB são mostradas em vermelho e azul, respectivamente. *Observe* as numerosas moléculas de clorofila ligadas, mostradas em verde, inclusive o par especial, assim como agregados de ferro e enxofre que facilitam a transferência de elétrons a partir do estroma. [Desenhada a partir de 1JB0.pdb]

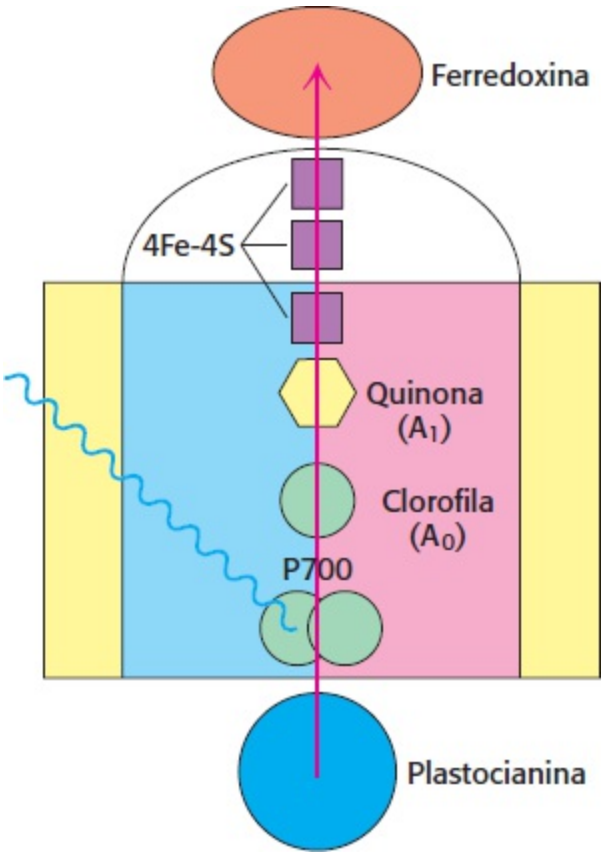


Figura 19.20 Fluxo de elétrons através do fotossistema I para ferredoxina. A absorção de luz induz a transferência de elétrons a partir de P700 por uma via de transferência de elétrons que inclui uma molécula de clorofila, uma molécula de quinona e três agregados 4Fe-4S até chegar a ferredoxina. A carga elétrica positiva deixada em P700 é neutralizada pela transferência de elétrons a partir da plastocianina reduzida.

$$Pc(Cu^{+}) + Fd_{ox} \xrightarrow{Luz} Pc(Cu^{2+}) + Fd_{red}$$

Visto que os potenciais de redução da plastocianina e da ferredoxina são +0,37 V e –0,45 V, respectivamente, a energia livre padrão dessa reação é + 79,1 kJ mol^{-1} (+18,9 kcal mol^{-1}). Essa reação "contra fluxo" é impulsionada pela absorção de um fóton de 700 nm, que tem uma energia de 171 kJ mol^{-1} (40,9 kcal mol^{-1}).

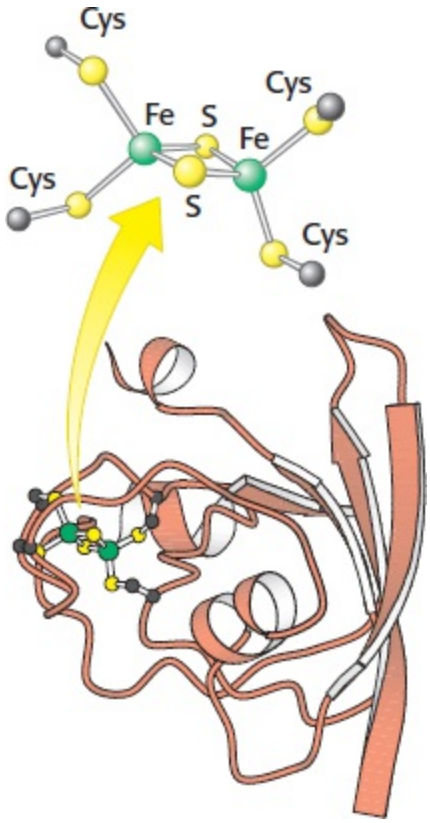


Figura 19.21 Estrutura da ferredoxina. Nas plantas a ferredoxina contém um agregado de 2Fe-2S. Essa proteína aceita elétrons provenientes do fotossistema I e os transporta para a ferredoxina-NADP redutase. [Desenhada a partir de 1FXA.pdb.]

A ferredoxina-$NADP^+$ redutase converte $NADP^+$ em NADPH

Embora a ferredoxina reduzida sejam um potente redutor, não é útil na indução de muitas reações, em parte porque a ferredoxina só transporte um elétron disponível. Em contrapartida, o NADPH, um redutor com dois elétrons, é um doador de elétrons muito utilizado nos processos de biossíntese, inclusive nas reações do ciclo de Calvin (Capítulo 20). Como a ferredoxina reduzida é empregada para impulsionar a redução de $NADP^+$ a NADPH? Essa reação é catalisada pela *ferredoxina-$NADP^+$ redutase*, uma flavoproteína com um grupo prostético FAD (Figura 19.22A). O grupo prostético FAD ligado aceita dois elétrons e dois prótons de duas moléculas de ferredoxina reduzida para formar $FADH_2$ (Figura 19.22B). A seguir, a enzima transfere um íon hidreto (H^-) para $NADP^+$ para formar NADPH. Essa reação ocorre no lado estromal da membrana. Assim sendo, a captação de um próton na redução de $NADP^+$ contribui ainda mais para a geração do gradiente de prótons através da membrana tilacoide.

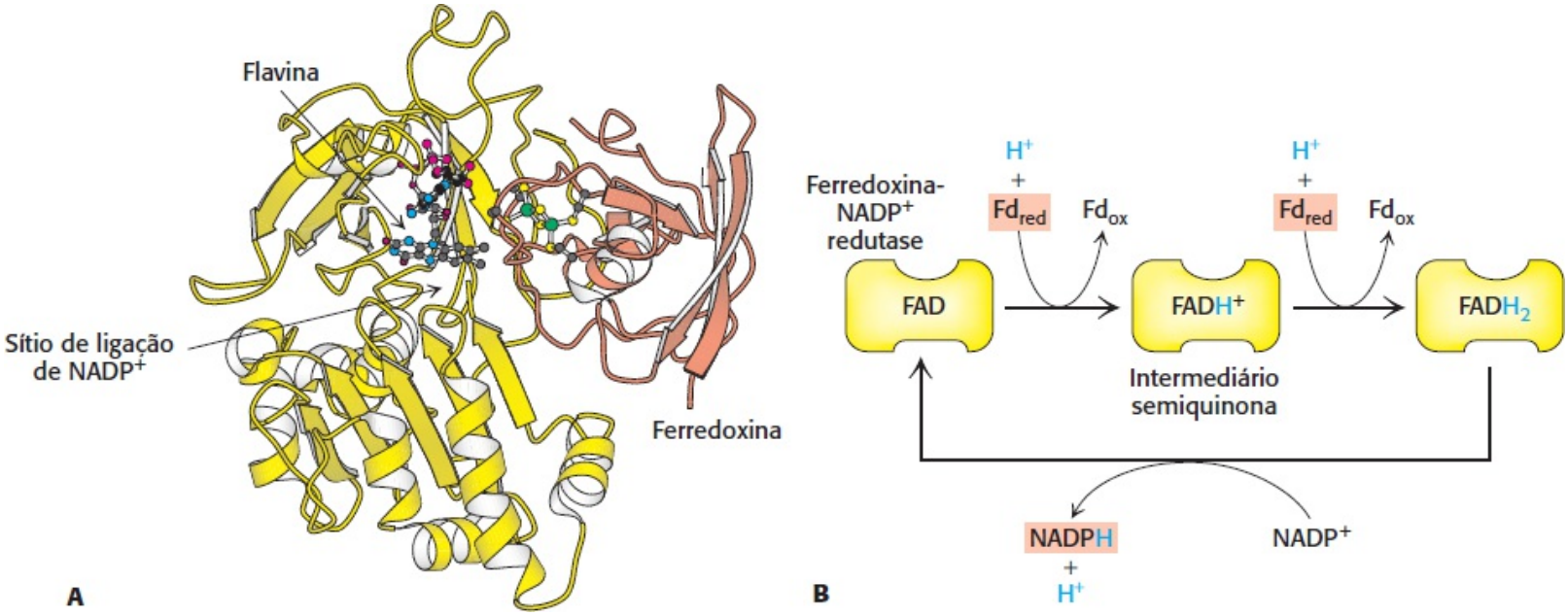


Figura 19.22 Estrutura e função da ferredoxina-NADP⁺ redutase. **A.** estrutura da ferredoxina-NADP⁺ redutase. Esta enzima aceita elétrons, um por vez, oriundos da ferredoxina (mostrada em cor laranja). **B.** A ferredoxina-NADP⁺ redutase aceita primeiro dois elétrons e dois prótons de duas moléculas de ferredoxina (Fd) reduzida para formar $FADH_2$, que depois transfere dois elétrons e um próton para $NADP^+$ com formação de NADPH. [Desenhada a partir de 1EWY.pdb.]

A cooperação entre o fotossistema I e o fotossistema II cria um fluxo de elétrons de H_2O para $NADP^+$. A via do fluxo de elétrons é denominada o *esquema Z da fotossíntese* porque o diagrama redox de P680 para P700* assemelha-se à letra Z (Figura 19.23).

19.4 Um gradiente de prótons através da membrana tilacoide impulsiona a síntese de ATP

Em 1966 André Jagendorf mostrou que os cloroplastos sintetizam ATP no escuro quando um gradiente de pH artificial é imposto através da membrana tilacoide. Para criar esse gradiente de pH temporário, ele colocou os cloroplastos em um tampão com pH = 4 durante algumas horas e, depois, misturou-os com um tampão de pH = 8 contendo ADP e P_i. O pH do estroma aumentou subitamente para 8, enquanto o pH do espaço tilacoide permaneceu em 4. *Uma salva de síntese de ATP acompanhou então o desaparecimento do gradiente de pH através da membrana tilacoide* (Figura 19.24). Essa experiência foi uma das primeiras a apoiar de modo inequívoco a hipótese apresentada por Peter Mitchell que a síntese de ATP é impulsionada por uma força próton-motriz.

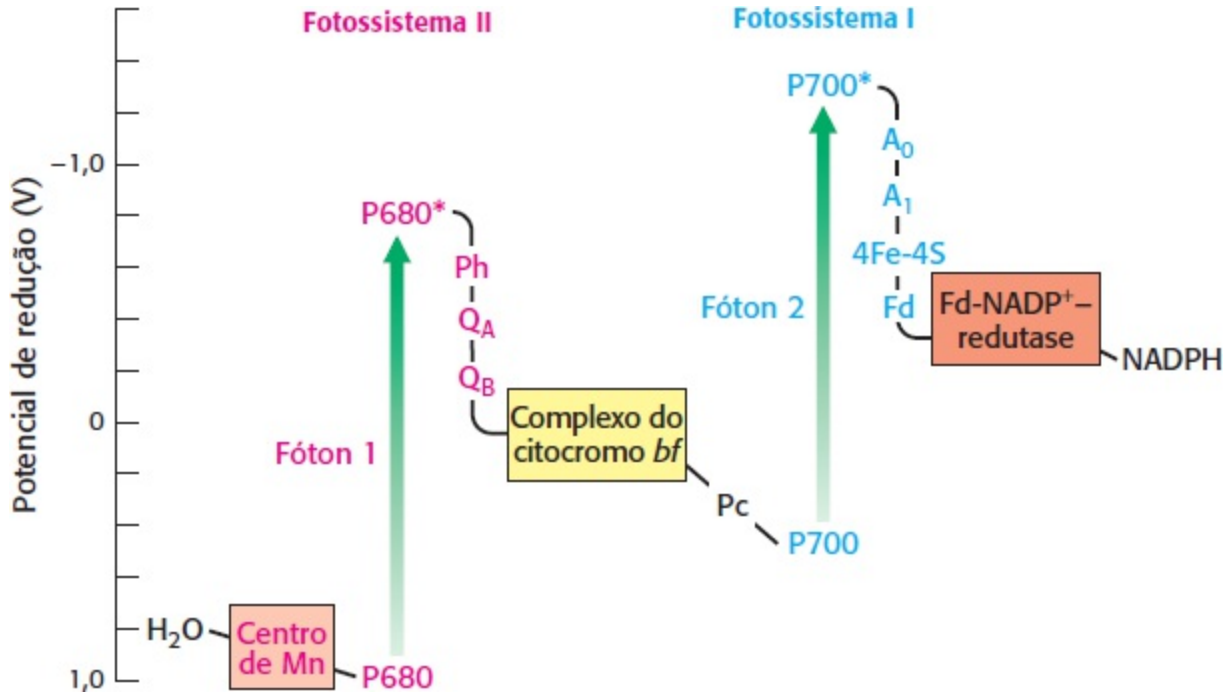


Figura 19.23 Via do fluxo de elétrons desde H_2O até $NADP^+$ na fotossíntese. Essa reação endergônica se torna possível graças à absorção de luz pelo fotossistema II (P680) e pelo fotossistema I (P700). Ph, feofitina; Q_A e Q_B, proteínas ligadoras de plastoquinona; Pc, plastocianina; A_0 e A_1, aceptores de elétrons provenientes de P700*; Fd, ferredoxina; Mn, manganês.

Os princípios da síntese de ATP nos cloroplastos são quase idênticos aos das mitocôndrias. *A formação de ATP é impulsionada por uma força próton-motriz, tanto na fotofosforilação como na fosforilação oxidativa.* Já vimos como a luz induz a transferência de elétrons através dos fotossistemas II e I e do complexo do citocromo *bf*. Em vários estágios desse processo os prótons são liberados para o lúmen tilacoide ou captados do estroma, gerando um gradiente de prótons. O gradiente é mantido porque a membrana tilacoide é essencialmente impermeável aos prótons. *O espaço tilacoide torna-se extremamente ácido, com o pH se aproximando de 4. O gradiente de prótons transmembrana fotoinduzido é de aproximadamente 3,5 unidades de pH.* Como foi discutido na Seção 18.4, a energia inerente ao gradiente de prótons, denominada *força próton-motriz* (Δp), é descrita como a soma de dois componentes: um gradiente de carga elétrica e um gradiente químico. Nos cloroplastos quase toda a Δp provém do gradiente de pH, enquanto nas mitocôndrias a contribuição do potencial de membrana é maior. O motivo dessa diferença é que a membrana tilacoide é muito permeável a Cl^- e Mg^{2+}. A transferência fotoinduzida de H^+ para o espaço tilacoide é acompanhada pela transferência de Cl^- no mesmo sentido ou de Mg^{2+} (1 Mg^{2+} para 2 H^+) no sentido oposto. Consequentemente, a neutralidade elétrica é mantida e nenhum potencial de membrana é gerado. O influxo de Mg^{2+} para o estroma tem uma participação na regulação do ciclo de Calvin (Seção 20.2). Um gradiente de pH de 3,5 unidades através da membrana tilacoide corresponde a uma força próton-motriz de 0,20 V ou um ΔG de –20,0 kJ mol^{-1} (–4,8 kcal mol^{-1}).

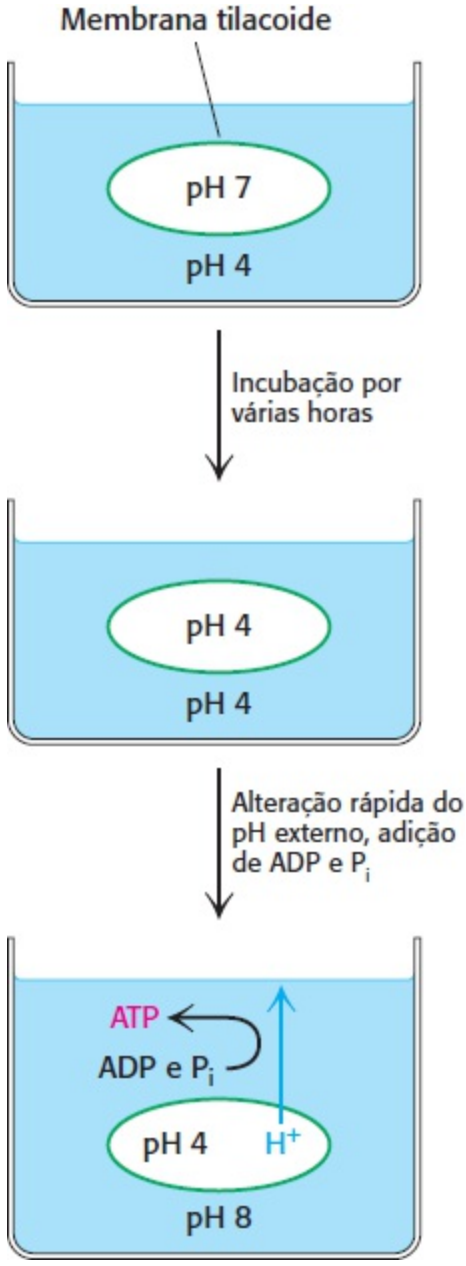


Figura 19.24 Demonstração de Jagendorf. Os cloroplastos sintetizam ATP após a imposição de um gradiente de pH.

A ATP sintase dos cloroplastos é muito semelhante à ATP sintase das mitocôndrias e dos procariotas

A força próton-motriz gerada pelas reações de fase clara é convertida em ATP pela *ATP sintase* dos cloroplastos, também denominada *complexo CF_1-CF_0* (*C* representa cloroplasto e *F* representa fator). A CF_1-CF_0 ATP sintase é muito parecida com o complexo F_1-F_0 das mitocôndrias (Seção 18.4). CF_0 conduz prótons através da membrana tilacoide, enquanto CF_1 catalisa a formação de ATP a partir de ADP e P_i.

CF_0 está embebido na membrana tilacoide, sendo constituído por quatro cadeias polipeptídicas diferentes conhecidas como I (17 kDa), II (16,5 kDa), III (8 kDa) e IV (27 kDa) com estequiometria estimada de 1 : 2 : 12 : 1. As subunidades I e II são semelhantes, quanto à sequência, à a subunidade **b** da subunidade F_0 mitocondrial; a subunidade III corresponde à subunidade **c** do complexo mitocondrial; e a subunidade IV é semelhante, em termos de sequência, à subunidade **a**. CF_1, o local da síntese de ATP, tem uma composição de subunidade de $\alpha_3\beta_3\gamma\Delta_\varepsilon$. As subunidades β contêm os sítios catalíticos, de modo semelhante ao da subunidade F_1 da ATP sintase mitocondrial. É digno de nota

que as subunidades β da ATP sintase em cloroplastos de milho apresentam mais de 60% da sequência de aminoácidos idêntica à da ATP sintase humana apesar de ter transcorrido aproximadamente 1 bilhão de anos desde a separação dos reinos animal e vegetal.

Observe que a orientação de membrana de CF_1-CF_0 está invertida em comparação com a da ATP sintase mitocondrial (Figura 19.25). Todavia, a orientação funcional das duas sintases é idêntica: prótons fluem do lúmen através da enzima para o estroma ou a matriz onde o ATP é sintetizado. Como CF_1 está na superfície estromal da membrana tilacoide, o ATP recém-sintetizado é liberado diretamente para o espaço estromal. Da mesma maneira, o NADPH formado pelo fotossistema I é liberado para o espaço estromal. Portanto, *ATP e NADPH, os produtos das reações de fase clara da fotossíntese, estão apropriadamente posicionados para as subsequentes reações de fase escura, nas quais CO_2 é convertido em carboidrato*.

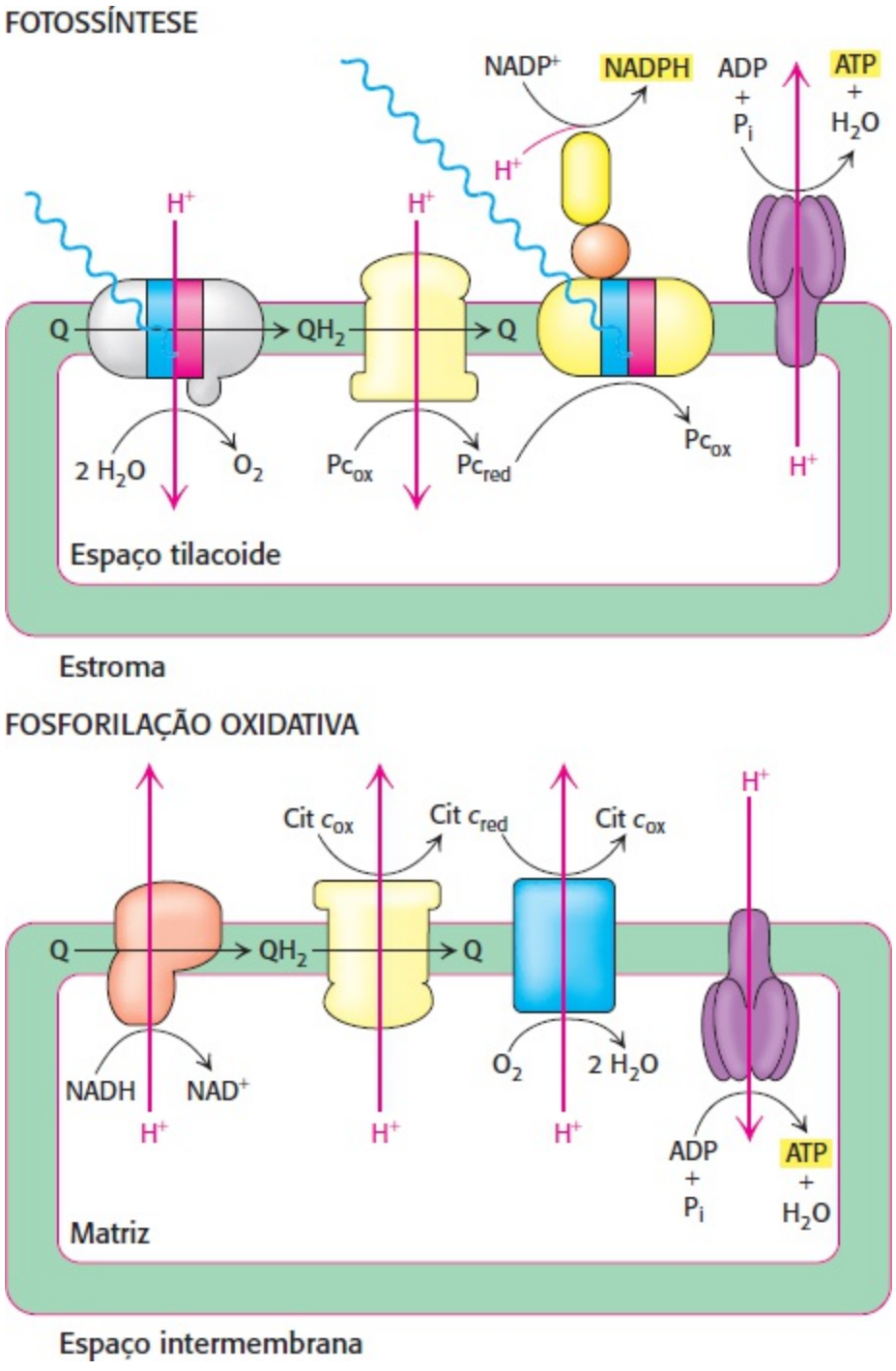


Figura 19.25 Comparação entre fotossíntese e fosforilação oxidativa. A transferência de elétrons fotoinduzida na fotossíntese impulsiona prótons para o lúmen tilacoide. O excesso de prótons flui para fora do lúmen através da ATP

sintase para formar ATP no estroma. Na fosforilação oxidativa o fluxo de elétrons pela cadeia de transporte de elétrons bombeia prótons para fora da matriz mitocondrial. O excesso de prótons proveniente do espaço intermembrana flui para a matriz através da ATP sintase para gerar ATP na matriz.

O fluxo cíclico de elétrons através do fotossistema I resulta na produção de ATP em vez de NADPH

Às vezes, quando a razão entre NADPH e $NADP^+$ está muito alta, como pode ocorrer se houver outra fonte de elétrons para formar NADPH (Seção 20.3), não há $NADP^+$ disponível para aceitar elétrons da ferredoxina reduzida. Nesse caso, os elétrons provenientes de P700, o centro de reação do fotossistema I, seguem uma via alternativa que não termina no NADPH. O elétron na ferredoxina reduzida é transferido para o complexo do citocromo *bf*, e não para $NADP^+$. Esse elétron flui de volta através do complexo do citocromo *bf* para reduzir a plastocianina, que depois é reoxidada pelo $P700^+$ para completar um ciclo. O desfecho efetivo desse fluxo cíclico de elétrons é o bombeamento de prótons pelo complexo do citocromo *bf*. O gradiente de prótons resultante impulsiona então a síntese de ATP. Nesse processo, denominado *fotofosforilação cíclica*, *ATP é gerado sem formação concomitante de NADPH* (Figura 19.26). O fotossistema II não participa na fotofosforilação cíclica e, assim, O_2 não é formado a partir de H_2O.

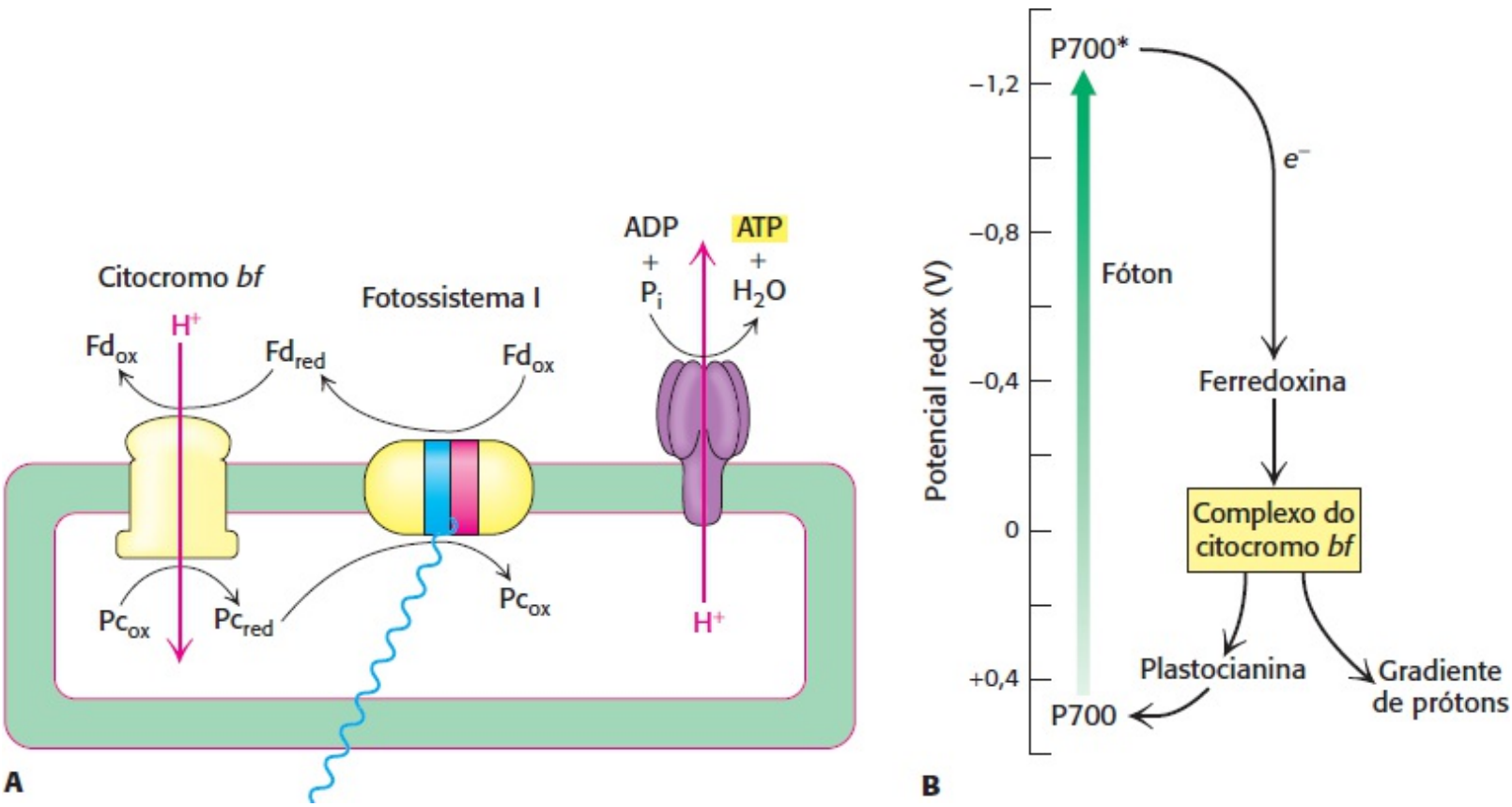


Figura 19.26 Fotofosforilação cíclica. A. Nessa via, os elétrons provenientes da ferredoxina reduzida são transferidos para o citocromo *bf,* e não para a ferredoxina-$NADP^+$ redutase. O fluxo de elétrons através do citocromo *bf* bombeia prótons para o lúmen tilacoide. Esses prótons fluem através da ATP sintase para gerar ATP. Nem NADPH nem O_2 são gerados por essa via. **B.** Esquema mostrando a base energética da fotofosforilação cíclica. Fd, ferredoxina; Pc, plastocianina.

A absorção de oito prótons resulta em um O_2, dois NADPH e três moléculas de ATP

Agora podemos estimar a estequiometria global das reações de fase clara. A absorção de quatro

prótons pelo fotossistema II gera uma molécula de O_2 e libera quatro prótons para o lúmen tilacoide. As duas moléculas de plastoquinol são oxidadas pelo ciclo Q do complexo do citocromo *bf* para liberar oito prótons para o lúmen. Por fim, os elétrons de quatro moléculas de plastocianina reduzida são impulsionados para ferredoxina pela absorção de quatro prótons adicionais. As quatro moléculas de ferredoxina reduzida geram duas moléculas de NADPH. Portanto, a reação global é

$$2\,H_2O + 2\,NADP^+ + 10\,H^+_{estroma} \rightarrow O_2 + 2\,NADPH + 12\,H^+_{lúmen}$$

Os 12 prótons liberados no lúmen podem, então, fluir através da ATP sintase. Visto que existem aparentemente 12 subunidades III em CF_0, podemos esperar que 12 prótons passem obrigatoriamente através de CF_0 para completar uma rotação de CF_1. Uma única rotação gera três moléculas de ATP. Tendo em vista a razão de 3 ATP para 12 prótons, a reação global é

$$\begin{aligned} 2\,H_2O + 2\,NADP^+ + 10\,H^+_{estroma} &\longrightarrow O_2 + 2\,NADPH + 12\,H^+_{lúmen} \\ 3\,ADP^{3-} + 3\,P_i^{2-} + 3\,H^+ + 12\,H^+_{lúmen} &\longrightarrow 3\,ATP^{4-} + 3\,H_2O + 12\,H^+_{estroma} \\ \hline 2\,NADP^+ + 3\,ADP^{3-} + 3\,P_i^{2-} + H^+ &\longrightarrow O_2 + 2\,NADPH + 3\,ATP^{4-} + H_2O \end{aligned}$$

Portanto, oito prótons são necessários para produzir três moléculas de ATP (2,7 prótons/ATP).

A fotofosforilação cíclica é uma forma um pouco mais produtiva de sintetizar ATP. A absorção de quatro fótons pelo fotossistema I resulta na liberação de oito prótons para o lúmen pelo sistema do citocromo *bf*. Esses prótons fluem através da ATP sintase para produzir duas moléculas de ATP. Assim, cada dois fótons absorvidos produzem uma molécula de ATP. Nenhum NADPH é produzido.

19.5 Pigmentos acessórios direcionam a energia para os centros de reação

Um sistema captador de luz que dependesse apenas das moléculas de clorofila *a* do par especial seria ineficiente por dois motivos. Primeiro, as moléculas de clorofila *a* absorvem luz apenas em comprimentos de onda específicos (ver Figura 19.6). Existe um grande hiato no meio da região visível do espectro, aproximadamente entre 450 e 650 nm. Esse hiato existe no ponto máximo de espectro solar, e a falha em coletar essa luz seria uma imensa perda de oportunidade. Segundo, mesmo em um dia sem nuvens, muitos fótons que podem ser absorvidos pela clorofila *a* atravessam o cloroplasto e não são absorvidos porque a densidade das moléculas de clorofila *a* em um centro de reação não é muito grande. Pigmentos acessórios, tanto clorofilas adicionais como outras classes de moléculas, estão associados aos centros de reação. *Esses pigmentos absorvem a luz e direcionam a energia para o centro de reação para conversão em formas químicas.* Os pigmentos acessórios não deixam o centro de reação "ficar à toa".

A transferência de energia por ressonância possibilita que a energia se desloque do local de absorvância inicial para o centro de reação

Como a energia é direcionada de um pigmento associado para um centro de reação? A absorção de um fóton nem sempre resultam em excitação e transferência de elétrons. Mais frequentemente, a energia de excitação é transferida de uma molécula para uma molécula próxima mediante interações

eletromagnéticas (Figura 19.27). A taxa desse processo, denominada *transferência de energia por ressonância*, depende muito da distância entre as moléculas doadoras de energia e as moléculas aceptoras de energia. O aumento da distância entre o doador e o aceptor por um fator de dois resulta tipicamente na redução da taxa de transferência de energia de um fator de $2^6 = 64$. Por causa da necessidade de conservação de energia, a transferência de energia tem de ser feita de um doador no estado excitado para um aceptor com energia igual ou menor. *O estado excitado do par especial de moléculas de clorofila tem menos energia do que o estado excitado de moléculas de clorofila isoladas, possibilitando que os centros de reação captem a energia transferida de outras moléculas* (Figura 19.28).

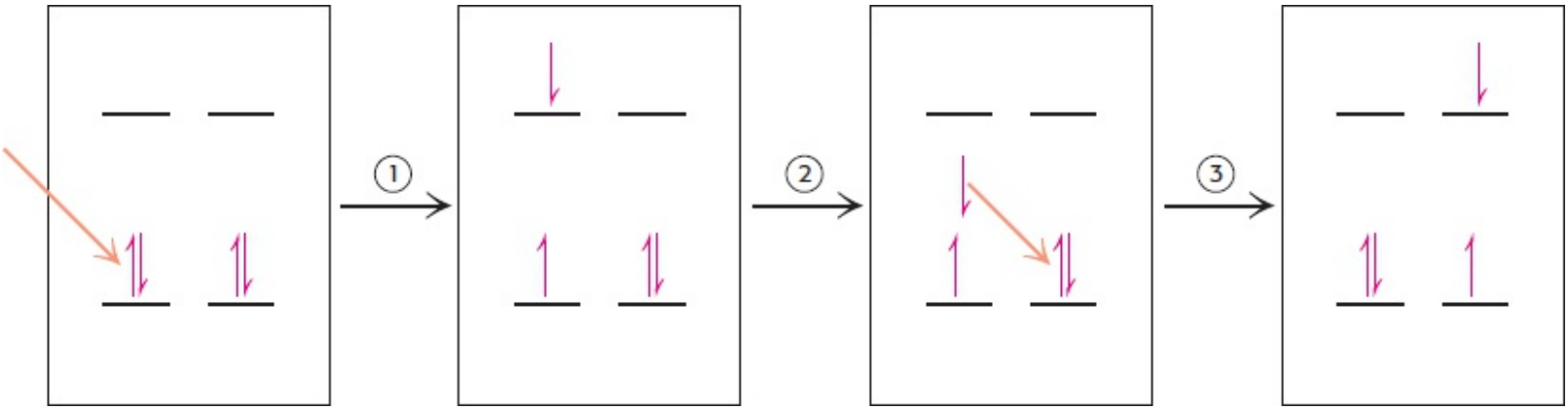


Figura 19.27 Transferência de energia por ressonância. **1.** Um elétron consegue aceitar energia de radiação eletromagnética de comprimento de onda apropriado e "pular" para um estado de energia mais alto. **2.** Quando o elétron excitado retorna ao seu estado de energia mais baixo, a energia absorvida é liberada. **3.** A energia liberada pode ser absorvida por um elétron em uma molécula próxima, e esse elétron "pula" para um estado de energia alta.

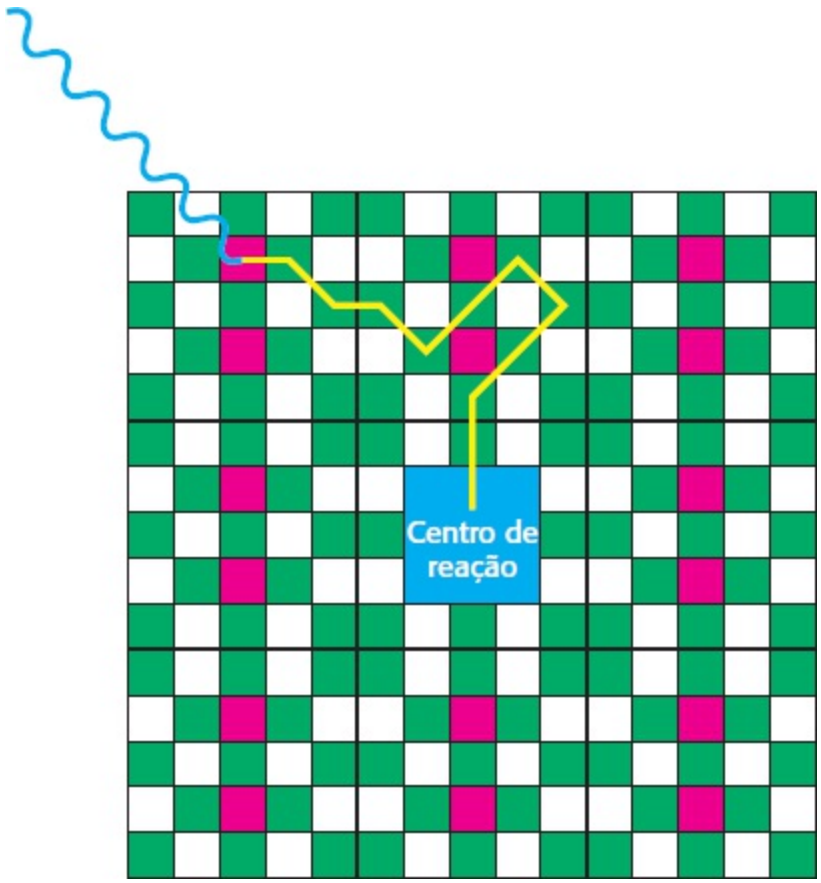


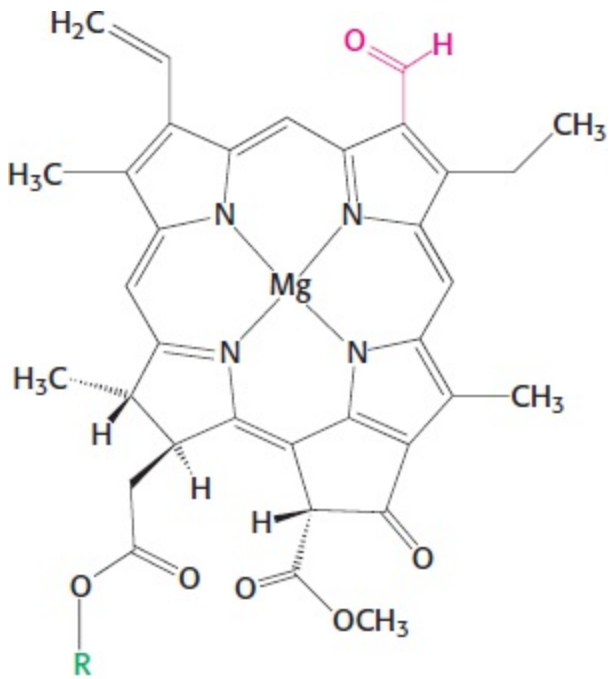
Figura 19.28 Transferência de energia dos pigmentos acessórios para os centros de reação. A energia luminosa absorvida por moléculas de clorofila acessórias ou outros pigmentos pode ser transferida para centros de reação, onde

impulsiona a separação fotoinduzida de carga elétrica. Os quadrados verdes representam as moléculas de clorofila acessórias e os quadrados vermelhos representam moléculas de carotenoides. Os quadrados brancos representam proteína.

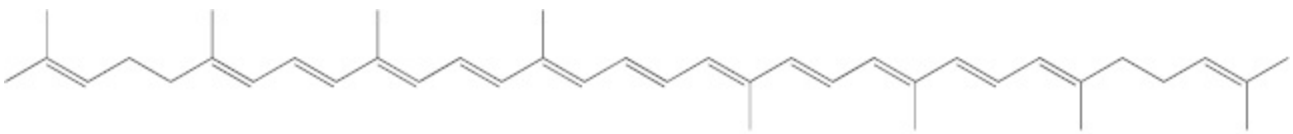
Complexos coletores de luz contêm clorofilas adicionais e carotenoides

A *clorofila b* e os *carotenoides* são importantes moléculas coletoras de luz que direcionam a energia para o centro de reação. A clorofila *b* difere da clorofila *a* porque tem um grupo formila em vez de um grupo metila. Essa pequena diferença desvia seus dois principais picos de absorção para o centro do espectro visível. Em termos mais específicos, a clorofila *b* absorve eficientemente luz com comprimentos de onda entre 450 e 550 nm (Figura 19.29).

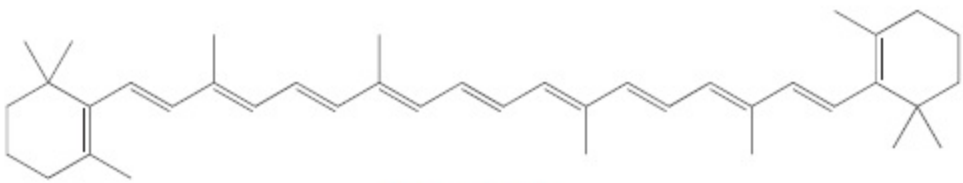
Os carotenoides são polienos estendidos que absorvem luz entre 400 e 500 nm. Os carotenoides são responsáveis pela maioria das frutas e flores de coloração amarela e vermelha. São também responsáveis pelas cores do outono, quando as moléculas de clorofila degradam, revelando os carotenoides.



Clorofila *b*



Licopeno



β-caroteno

Além de sua participação na transferência de energia para os centros de reação, os carotenoides exercem uma função de salvaguarda. Os carotenoides suprimem as reações fotoquímicas lesivas, sobretudo aquelas incluindo oxigênio que podem ser induzidas pela luz solar forte. Essa proteção é

especialmente importante no outono quando o pigmento primário clorofila está sendo degradado e não consegue absorver energia luminosa. As plantas sem carotenoides são rapidamente destruídas quando são expostas à luz e ao oxigênio.

Os pigmentos acessórios estão dispostos em numerosos *complexos coletores de luz* que circundam por completo o centro de reação. A subunidade com 26 kDa do complexo coletor de luz II (LHC-II) é a proteína de membrana mais abundante nos cloroplastos. Essa subunidade se liga a sete moléculas de clorofila *a*, seis moléculas de clorofila *b* e duas moléculas de carotenoides. Conjuntos coletores de luz semelhantes são encontrados em bactérias fotossintéticas (Figura 19.30).

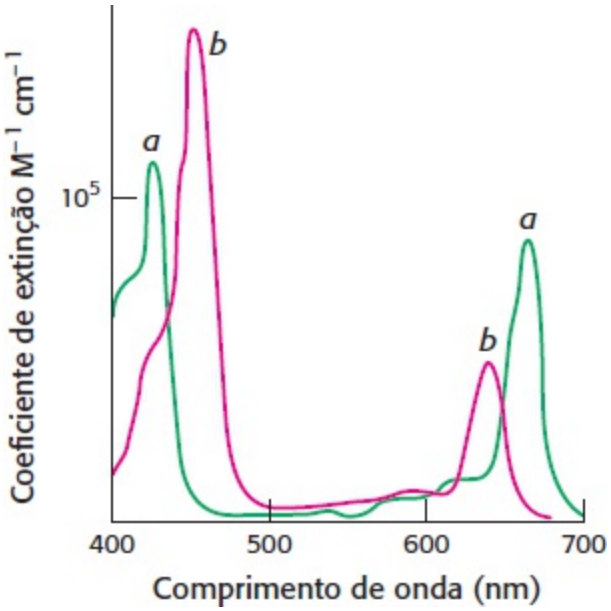


Figura 19.29 Espectros de absorção das clorofilas *a* e *b*.

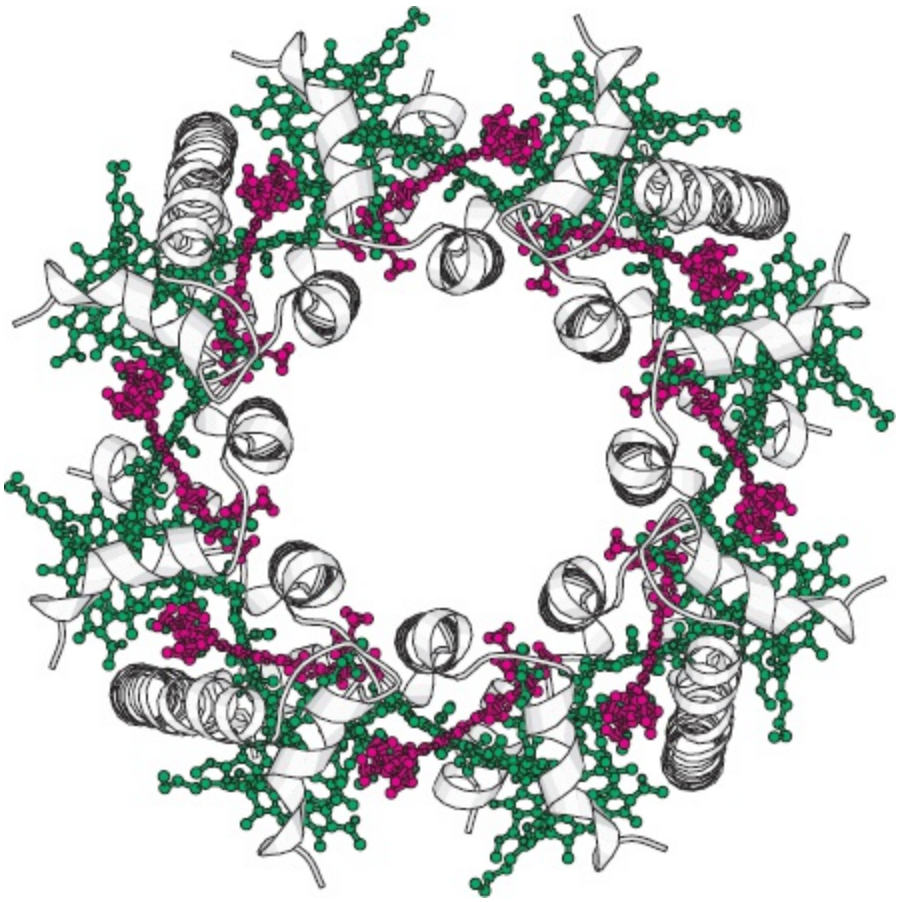


Figura 19.30 Estrutura de um complexo bacteriano coletor de luz. Oito polipeptídios, cada um se conectando a três moléculas de clorofila (verde) e uma molécula de carotenoide (vermelho), circundam uma cavidade central que contém o centro de reação (não mostrado). *Observe* a elevada concentração de pigmentos acessórios que circundam o centro de reação. [Desenhada a partir de LGH.pdb.].

Os componentes da fotossíntese são extremamente organizados

A complexidade da fotossíntese, já mostrada na elaborada inter-relação dos complexos componentes, estende-se até o posicionamento dos componentes na membrana tilacoide. *As membranas tilacoides da maioria das plantas são diferenciadas em regiões empilhadas e não empilhadas* (ver Figuras 19.2 e 19.3). O empilhamento aumenta a quantidade de membrana tilacoide em um dado volume de cloroplastos. As duas regiões circundam um espaço tilacoide interno comum; entretanto, apenas as regiões não empilhadas entram em contato direto com o estroma do cloroplasto. As regiões empilhadas e não empilhadas diferem na natureza de seus componentes fotossintéticos (Figura 19.31). O fotossistema I e a ATP sintase estão localizados quase exclusivamente nas regiões não empilhadas, enquanto o fotossistema II é encontrado sobretudo nas regiões empilhadas. O complexo do citocromo *bf* é encontrado nas duas regiões. Na verdade, esse complexo se desloca rapidamente entre as regiões empilhadas e não empilhadas. A plastoquinona e a plastocianina são os carreadores móveis dos elétrons entre os componentes localizados em diferentes regiões da membrana tilacoide. Um espaço tilacoide interno comum possibilita que os prótons liberados pelo fotossistema II nas membranas empilhadas sejam utilizados pelas moléculas da ATP sintase que estão localizadas longe das membranas não empilhadas.

Qual é a importância funcional dessa diferenciação lateral do sistema da membrana tilacoide? O posicionamento do fotossistema I nas membranas não empilhadas também lhe permite acesso direto ao estroma para a redução de $NADP^+$. A ATP sintase também está localizada na região não empilhada que dá espaço ao seu grande glóbulo CF_1 e acesso a ADP. Em contrapartida, o pouco espaço disponível na região empilhada não gera problemas para o fotossistema II, que interage com um pequeno doador polar de elétrons (H_2O) e um carreador de elétrons extremamente lipossolúvel (plastoquinona).

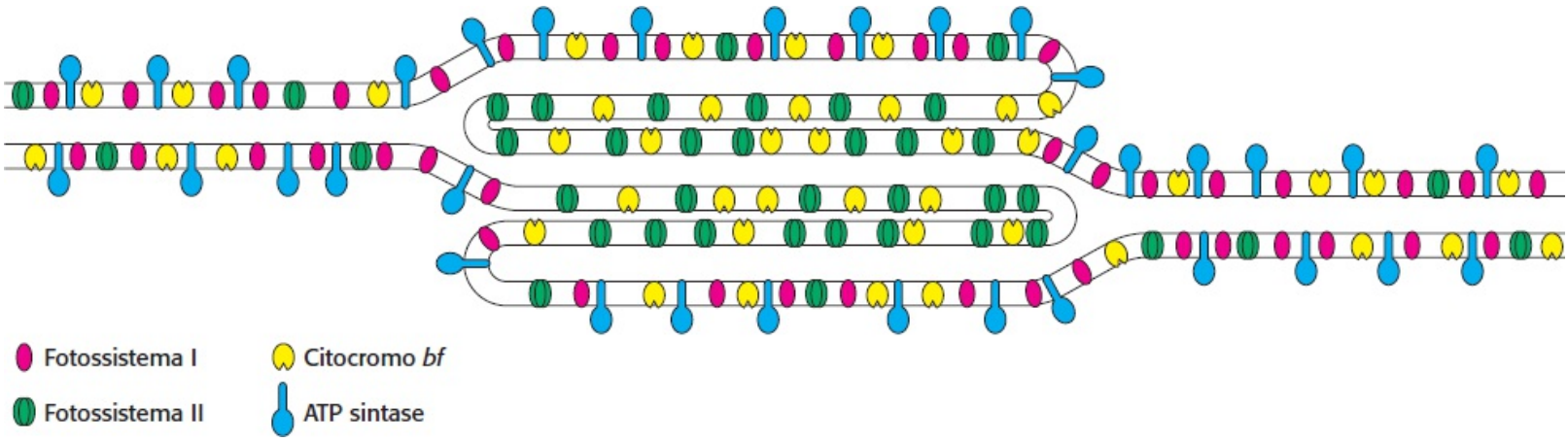
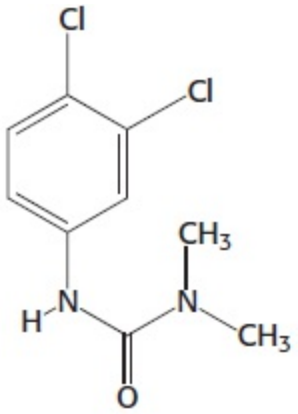
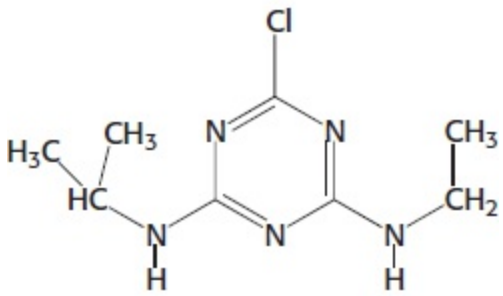


Figura 19.31 Localização dos componentes da fotossíntese. Os componentes da fotossíntese estão distribuídos de modo diferenciado nas regiões empilhadas e não empilhadas das membranas tilacoides. [De um desenho gentilmente oferecido por Dr. Jan M. Anderson e Dr. Bertil Andersson.]



Diuron



Atrazina

Muitos herbicidas inibem as reações de fase clara da fotossíntese

Muitos herbicidas comercializados destroem as plantas daninhas ao interferirem na ação do fotossistema II ou do fotossistema I. Os inibidores do fotossistema II bloqueiam o fluxo de elétrons, enquanto os inibidores do fotossistema I desviam elétrons da parte terminal desse fotossistema. Os inibidores do fotossistema II incluem derivados da ureia como *diuron* e derivados da triazina como a *atrazina*. Essas substâncias químicas se ligam ao sítio Q_B da subunidade D1 do fotossistema II e bloqueiam a formação de plastoquinol (QH_2).

Paraquat (1,1′-dimetil-4-4′-bipiridinio) é um inibidor do fotossistema I. Paraquat, um dicátion, consegue aceitar elétrons do fotossistema I e torna-se um radical. Esse radical reage com O_2 e produz espécies reativas de oxigênio, tais como superóxido (O_2^-) e radical hidroxila (OH•). Essas espécies reativas de oxigênio reagem com as ligações duplas nos lipídios da membrana, lesionando-a.

19.6 A capacidade de converter a luz em energia química é antiga

A capacidade de converter energia luminosa em energia química é uma tremenda vantagem em termos evolutivos. Evidências geológicas sugerem que a fotossíntese oxigênica se tornou importante há aproximadamente 2 bilhões de anos. Os sistemas de fotossíntese anoxigênicos surgiram muito antes na história de 3,5 bilhões de anos do planeta Terra (Tabela 19.1). O sistema de fotossíntese da bactéria púrpura não sulfurosa *Rhodopseudomonas viridis* apresenta muitos aspectos em comum com os sistemas de fotossíntese oxigênica e, obviamente, é anterior a eles. Bactérias verdes sulfurosas como *Chlorobium thiosulfatophilum* realizam uma reação que também parece ter surgido antes da fotossíntese oxigênica e ainda mais parecida com a fotossíntese oxigênica que a da *R. viridis*. As espécies de enxofre reduzidas, como H_2S, são doadoras de elétrons na reação global

de fotossíntese:

$$CO_2 + 2\,H_2S \xrightarrow{\text{Luz}} (CH_2O) + 2\,S + H_2O$$

Não obstante, a fotossíntese não surgiu imediatamente na origem da vida. Não foram descobertos organismos com capacidade de fotossíntese no domínio Archaea, implicando que a fotossíntese evoluiu no domínio Bacteria após a divergência de Archaea e Bacteria a partir de um ancestral comum. Todavia, todos os domínios vivos apresentam em comum cadeias de transporte de elétrons. Como já foi descrito, componentes como ubiquinona-citocromo *c* oxirredutase e a família do citocromo *bf*, são encontrados nas cadeias de transferência de elétrons respiratórias e fotossintéticas. Esses componentes foram as bases da evolução dos sistemas de captação da energia luminosa.

Tabela 19.1 Principais grupos de procariotos fotossintéticos.

Bactérias	Doador fotossintético de elétrons	Uso de O_2
Verdes sulfurosas	H_2, H_2S, S	Anoxigênicas
Verdes não sulfurosas	Vários aminoácidos e ácidos orgânicos	Anoxigênicas
Púrpuras sulfurosas	H_2, H_2S, S	Anoxigênicas
Púrpuras não sulfurosas	Geralmente moléculas orgânicas	Anoxigênicas
Cianobactérias	H_2O	Oxigênicas

Resumo

19.1 A fotossíntese ocorre nos cloroplastos

As proteínas que participam nas reações de fase clara da fotossíntese estão localizadas nas membranas tilacoides dos cloroplastos. As reações de fase clara resultam em (1) criação de poder redutor para a produção de NADPH, (2) geração de um gradiente de prótons transmembrana para a formação de ATP e (3) produção de O_2.

19.2 A absorção de luz pela clorofila induz a transferência de elétrons

As moléculas de clorofila – tetrapirróis com um íon magnésio central – absorvem a luz de modo muito eficiente porque são polienos. Um elétron excitado até um estado de alta energia pela absorção de um fóton consegue se mover para os aceptores de elétrons próximos. Na fotossíntese um elétron excitado deixa um par de moléculas de clorofila conhecido como par especial. O cerne funcional da fotossíntese, um centro de reação, de uma bactéria fotossintética foi estudado meticulosamente. Nesse sistema o elétron se move do par especial (contendo bacterioclorofila) para uma bacteriofeofitina (uma bacterioclorofila sem o íon magnésio central) e, daí, para as quinonas. A redução das quinonas resulta na geração de um gradiente de prótons, que impulsiona a síntese de ATP de modo análogo ao da fosforilação oxidativa.

19.3 Dois fotossistemas geram um gradiente de prótons e NADPH na fotossíntese oxigênica

A fotossíntese em plantas verdes é mediada por dois fotossistemas conectados. No fotossistema II a excitação de um par especial das moléculas de clorofila (denominado P680) resulta na transferência de elétrons para plastoquinona de modo análogo ao do centro de reação bacteriano. Os elétrons são repostos pela extração de elétrons de uma molécula de água em um centro contendo quatro íons manganês. Uma molécula de O_2 é gerada nesse centro para cada quatro elétrons transferidos. O plastoquinol produzido no fotossistema II é reoxidado pelo complexo do citocromo *bf*, que transfere os elétrons para a plastocianina, uma metaloproteína (cobre) solúvel. A partir da plastocianina, os elétrons entram no fotossistema I. No fotossistema I, a excitação do par especial P700 libera elétrons que fluem para a ferredoxina, um potente redutor. A ferredoxina-$NADP^+$ redutase, uma flavoproteína localizada no lado estromal da membrana, depois catalisa a formação de NADPH. Um gradiente de prótons é gerado à medida que os elétrons atravessam o fotossistema II, por meio do complexo do citocromo *bf* e da ferredoxina-$NADP^+$ redutase.

19.4 Um gradiente de prótons através da membrana tilacoide impulsiona a síntese de ATP

O gradiente de prótons através da membrana tilacoide cria uma força próton-motriz, usada pela ATP sintase para formar ATP. A ATP sintase dos cloroplastos (também denominada CF_0-CF_1) é muito semelhante aos grupos sintetizadores de ATP das bactérias e mitocôndrias (F_0-F_1). Se a razão NADPH:$NADP^+$ for elevada, os elétrons transferidos para a ferredoxina pelo fotossistema I conseguem reentrar no complexo do citocromo *bf*. Esse processo, denominado fotofosforilação cíclica, resulta na geração de um gradiente de prótons pelo complexo do citocromo *bf* sem a formação de NADPH ou O_2.

19.5 Pigmentos acessórios direcionam a energia para os centros de reação

Os complexos coletores de luz que circundam os centros de reação contêm moléculas adicionais de clorofila *a*, assim como carotenoides e moléculas de clorofila *b*, que absorvem luz no centro do espectro visível. Esses pigmentos acessórios aumentam a eficiência da captação de luz ao absorver a luz e transferir a energia para os centros de reação (transferência de energia por ressonância).

19.6 A capacidade de converter a luz em energia química é antiga

Os fotossistemas compartilham características estruturais, sugerindo uma origem evolutiva comum. As semelhanças na organização e na estrutura molecular com a organização e a estrutura molecular da fosforilação oxidativa sugerem que o aparato fotossintético evoluiu a partir de um sistema de transdução de energia mais antigo.

Palavras-chave

ATP sintase (complexo CF_1-CF_0) (p. 582)
carotenoide (p. 586)

centro de manganês (p. 578)
centro de reação (p. 573)
citocromo *bf* (p. 579)
clorofila *a* (p. 572)
cloroplasto (p. 571)
complexo coletor de luz (p. 586)
esquema Z de fotossíntese (p. 581)
estroma (p. 571)
força próton-motriz (p. 582)
fotofosforilação cíclica (p. 584)
fotossistema I (PS I) (p. 576)
fotossistema II (PS II) (p. 576)
granum (p. 571)
membrana tilacoide (p. 571)
P680 (p. 577)
P700 (p. 580)
P960 (p. 575)
par especial (p. 574)
reações de fase clara (p. 570)
separação fotoinduzida de carga elétrica (p. 573)

Questões

1. *Poderes complementares.* O fotossistema I produz um potente redutor, enquanto o fotossistema II produz um potente agente oxidante. Identifique o redutor e o oxidante e descreva suas atuações.

2. *Se um pouco é bom.* Qual é a vantagem de apresentar um significativo conjunto de membranas tilacoides nos cloroplastos?

3. *Cooperação.* Explique como os complexos coletores de luz aumentam a eficiência da fotossíntese.

4. *Uma coisa leva a outra.* Qual é o último aceptor de elétrons na fotossíntese? Qual é o último doador de elétrons? O que impulsiona o fluxo de elétrons entre o doador e o aceptor?

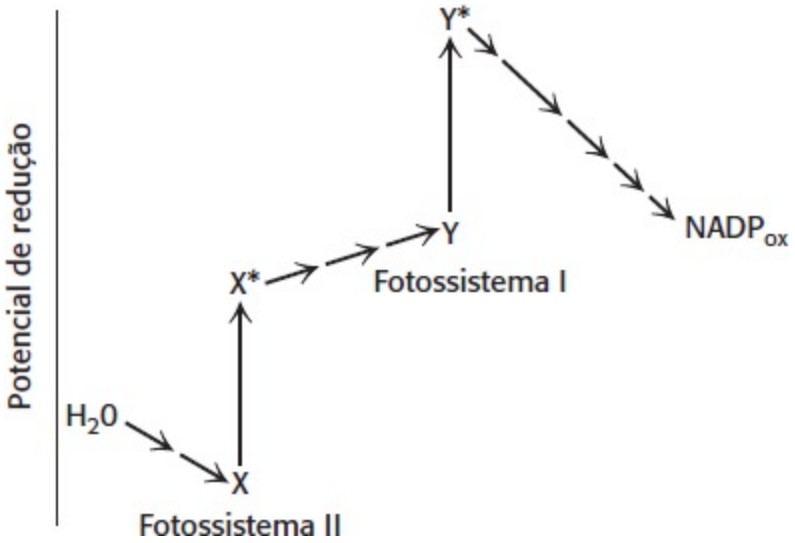
5. *Compensação da neutralização*. Nos cloroplastos é necessário um maior gradiente de pH através da membrana tilacoide para impulsionar a síntese de ATP do que o necessário através da membrana interna mitocondrial. Explique essa diferença.

6. *Ambientalmente apropriado*. A clorofila é uma molécula hidrofóbica. Por que essa propriedade é crucial para a função da clorofila?

7. *Origens dos prótons.* Quais são as várias fontes de prótons que contribuem para a geração de um gradiente de prótons nos cloroplastos?

8. *A eficiência é muito importante.* Que fração da energia da luz a 700 nm absorvida pelo fotossistema I é retida na forma de elétrons de alta energia?

9. *Não está certo*. Explique o(s) defeito(s) no esquema hipotético mostrado aqui para as reações de fase clara da fotossíntese.



10. *Transferência de elétrons*. Calcule $\Delta E'_0$ e $\Delta G^{o'}$ para a redução de $NADP^+$ pela ferredoxina. Use os dados apresentados na Tabela 18.1.

11. *Avanço audacioso*. (a) Pode-se argumentar que, se houvesse vida em outros planetas, ela precisaria de algum processo semelhante à fotossíntese. Por que esse argumento é razoável? (b) Se a nave estelar *Enterprise* pousasse em um planeta distante e não encontrasse oxigênio mensurável na atmosfera, a tripulação poderia concluir que não haveria fotossíntese?

12. *Herbicida 1*. O herbicida diclorofenildimetilureia (DCMU) interfere na fotofosforilação e na liberação de O_2. Todavia, não bloqueia a liberação de O_2 na presença de um aceptor de elétrons artificial como ferricianeto. Proponha um local para a ação inibitória do herbicida DCMU.

13. *Herbicida 2*. Preveja o efeito do herbicida diclorofenildimetilureia (DCMU) na capacidade da planta de realizar a fotofosforilação cíclica.

14. *Coleta de infravermelho*. Considere a correlação entre a energia de um fóton e seu comprimento de onda.

(a) Algumas bactérias conseguem coletar luz no comprimento de onda 1.000 nm. Qual é a energia (em quilojoules ou quilocalorias) de um mol (também denominado Einstein) de fótons de 1.000 nm?

(b) Qual é o aumento máximo do potencial redox que pode ser induzido por um fóton de 1.000 nm?

(c) Qual é o número mínimo de fótons de 1.000 nm necessário para formar ATP a partir de ADP e P_i? Pressuponha um ΔG de 50 kJ mol^{-1} (12 kcal mol^{-1}) para a reação de fosforilação.

15. *Aceptores perdidos*. Suponha que foi preparado um centro de reação bacteriano contendo apenas o par especial e as quinonas. Visto que o par especial e a quinona mais próxima estão separados por 22 Å, calcule a taxa de transferência de elétrons entre o par especial excitado e essa quinona.

16. *Bem perto*. Suponha que a transferência de energia entre duas moléculas de clorofila *a* separadas por 10 Å ocorre em 10 picossegundos. Suponha que essa distância seja aumentada para 20 Å e todos os outros fatores permaneçam os mesmos. Em quanto tempo a transferência de energia ocorria?

Questões | Integração de capítulos

17. *Equivalentes funcionais*. Qual característica estrutural das mitocôndrias corresponde às

membranas tilacoides?

18. *Compare e estabeleça as diferenças*. Compare e descreva as diferenças entre a fosforilação oxidativa e a fotossíntese.

19. *Energia faz a diferença*. Na página 584, foi mostrado um balanço do custo energético da síntese de glicose impulsionada por fotossíntese. Dezoito moléculas de ATP são necessárias. Ainda assim, quando a glicose sofre combustão na respiração celular, 30 moléculas de ATP são produzidas. Explique a diferença.

20. *À procura de um lugar para repousar.* Albert Szent-Györgyi, bioquímico e ganhador do Prêmio Nobel, disse algo muito interessante: a vida nada mais é que um elétron à procura de um lugar para repousar. Explique como essa declaração se aplica à fotossíntese e à respiração celular.

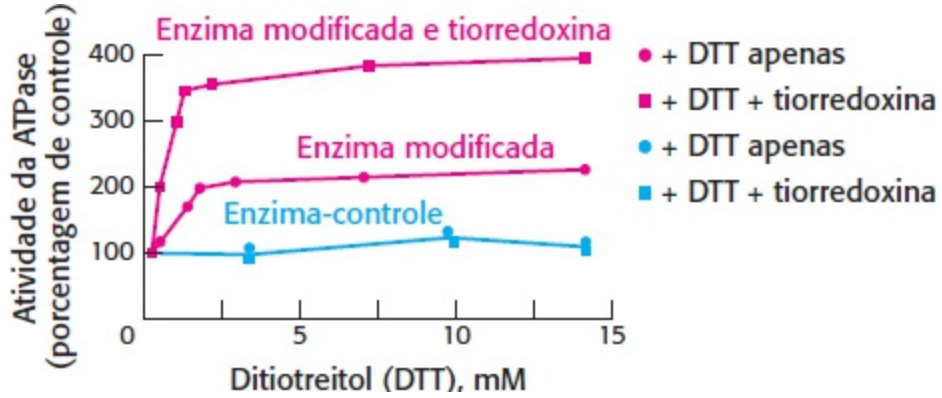
Questão sobre mecanismo

21. *Reação de Hill.* Em 1939 Robert Hill descobriu que os cloroplastos produzem O_2 quando são iluminados na presença de um aceptor de elétrons artificial como o ferricianeto $[Fe^{3+}\ (CN)_6]^{3-}$. O ferricianeto é reduzido a ferrocianeto $[Fe^{2+}\ (CN)_6]^{4-}$ neste processo. Não são produzidos NADPH nem plastocianina reduzida. Proponha um mecanismo para a reação de Hill.

Interpretação de dados e integração de capítulos

22. *O mesmo, mas diferente*. O complexo $\alpha_3\beta_3\gamma$ da ATPase de mitocôndrias ou cloroplastos funcionará como uma ATPase *in vitro*. A enzima de cloroplastos (tanto a sintase como a atividade da ATPase) é sensível ao controle redox, enquanto a enzima de mitocôndrias não é sensível. Para determinar as diferenças entre as enzimas, um segmento da subunidade γ mitocondrial foi retirado e substituído pelo segmento equivalente da subunidade γ dos cloroplastos. A atividade da ATPase da enzima modificada foi depois mensurada em função das condições redox.

(a) Qual é o regulador redox da ATP sintase *in vivo*? O gráfico adiante mostra a atividade da ATPase das enzimas modificadas e do controle sob várias condições redox.



[Dados de O. Bald *et al. J. Biol. Chem*. 275:12757-12762, 2000.]

(b) Qual é o efeito do aumento progressivo do poder redutor da mistura para as enzimas-controle e para as enzimas modificadas?

(c) Qual é o efeito do acréscimo de tiorredoxina? Como esses resultados diferem dos encontrados na

presença apenas de DTT? Sugira uma possível explicação para a diferença.

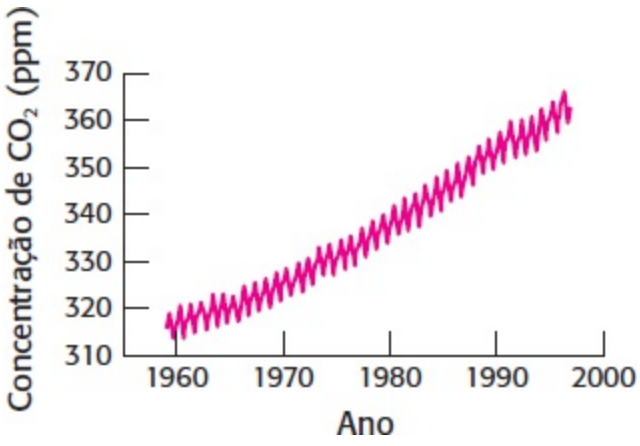
(d) Os pesquisadores conseguiram identificar a região da subunidade γ responsável pela regulação redox?

(e) Qual é a base racional da regulação por concentrações elevadas de agentes redutores?

(f) Quais aminoácidos na subunidade γ são mais provavelmente afetados pelas condições redutoras?

(g) Que experiências poderiam confirmar a sua resposta à parte *e*?

Ciclo de Calvin e a Via das Pentoses Fosfato



Medições do dióxido de carbono atmosférico em Mauna Loa, Havaí. Essas medições mostram ciclos anuais que resultam da variação sazonal da fixação do dióxido de carbono pelo ciclo de Calvin nas plantas terrestres. Grande parte dessa fixação ocorre em florestas tropicais, que são responsáveis por aproximadamente 50% da fixação terrestre. [Dennis Potokar/Photo Researchers.]

SUMÁRIO

20.1 O ciclo de Calvin sintetiza hexoses a partir do dióxido de carbono e da água
20.2 Aatividade do ciclo de Calvin depende das condições ambientais
20.3 Avia das pentoses fosfato gera NADPH e sintetiza açúcares de cinco carbonos
20.4 O metabolismo da glicose 6-fosfato pela via das pentoses fosfato é coordenado com a glicólise
20.5 Aglicose 6-fosfato desidrogenase desempenha um papel essencial na proteção contra espécies reativas de oxigênio

A fotossíntese ocorre em duas etapas: as reações de luz (fase fotoquímica, fase luminosa ou fase clara) e as reações de obscuridade (fase química, fase escura). As reações de luz, discutidas no Capítulo 19, transformam a energia luminosa em ATP e em poder redutor para biossíntese, o NADPH. As reações no escuro (de obscuridade) utilizam o ATP e o NADPH produzidos pelas reações de luz para reduzir átomos de carbono de seu estado totalmente oxidado, o dióxido de carbono, em um estado mais reduzido, na forma de hexose. Por conseguinte, o dióxido de carbono é retido em uma forma útil para muitos processos e, particularmente, como fonte de energia. Em seu conjunto, *as reações de luz e as reações de obscuridade da fotossíntese cooperam para transformar a energia luminosa em combustível de carbono.* As reações de obscuridade, também conhecidas como *ciclo de Calvin,* em homenagem ao bioquímico Melvin Calvin, que as elucidou, são assim chamadas porque, diferentemente das reações de luz, não dependem diretamente da presença de luz.

A segunda metade deste capítulo examinará uma via comum a todos os organismos, conhecida também como via das pentoses fosfato, via da hexose monofosfato, via do fosfogliconato ou derivação das pentoses. Ela possibilita que a glicose seja oxidada para produzir NADPH, *a "moeda corrente" de poder redutor prontamente disponível nas células.* O grupo fosforila no grupo 2′-hidroxila de uma das unidades de ribose do NADPH distingue o NADPH do NADH. *Existe uma diferença fundamental entre o NADPH e o NADH em bioquímica: o NADH é oxidado pela cadeia respiratória para gerar ATP, enquanto o NADPH serve como redutor em processos de biossíntese.* A via das pentoses fosfato também pode ser usada para o catabolismo das pentoses da alimentação, para a síntese de pentoses utilizadas na biossíntese de nucleotídios e para o catabolismo e a síntese dos açúcares menos comuns de quatro e sete carbonos. A via das pentoses fosfato e o ciclo de Calvin compartilham várias enzimas e intermediários que atestam um parentesco evolutivo. À semelhança da glicólise e da gliconeogênese, essas vias são imagens especulares uma da outra: o ciclo de Calvin utiliza o NADPH para reduzir o dióxido de carbono, gerando hexoses, enquanto a via das pentoses fosfato degrada a glicose a dióxido de carbono, gerando NADPH.

20.1 O ciclo de Calvin sintetiza hexoses a partir do dióxido de carbono e da água

Conforme assinalado no Capítulo 16, a glicose pode ser formada a partir de precursores que não são carboidratos, como lactato e aminoácidos, pela gliconeogênese. A energia que impulsiona a gliconeogênese provém, em última análise, do catabolismo prévio de combustíveis de carbono. Em contrapartida, os organismos fotossintéticos podem utilizar o ciclo de Calvin para sintetizar glicose a partir do gás dióxido de carbono e da água, usando a luz solar como fonte de energia. O ciclo de

Calvin introduz todos os átomos de carbono que serão utilizados como combustível e como estruturas de carbono das biomoléculas. Os organismos fotossintéticos são denominados *autótrofos* (literalmente, "autoalimentadores"), visto que são capazes de converter a luz solar em energia química, a qual é mais tarde usada para impulsionar seus processos de biossíntese. Os organismos que obtêm energia exclusivamente de combustíveis químicos são denominados *heterótrofos;* estes dependem, em última análise, dos autótrofos para suas fontes de energia.

O ciclo de Calvin compreende três estágios (Figura 20.1):

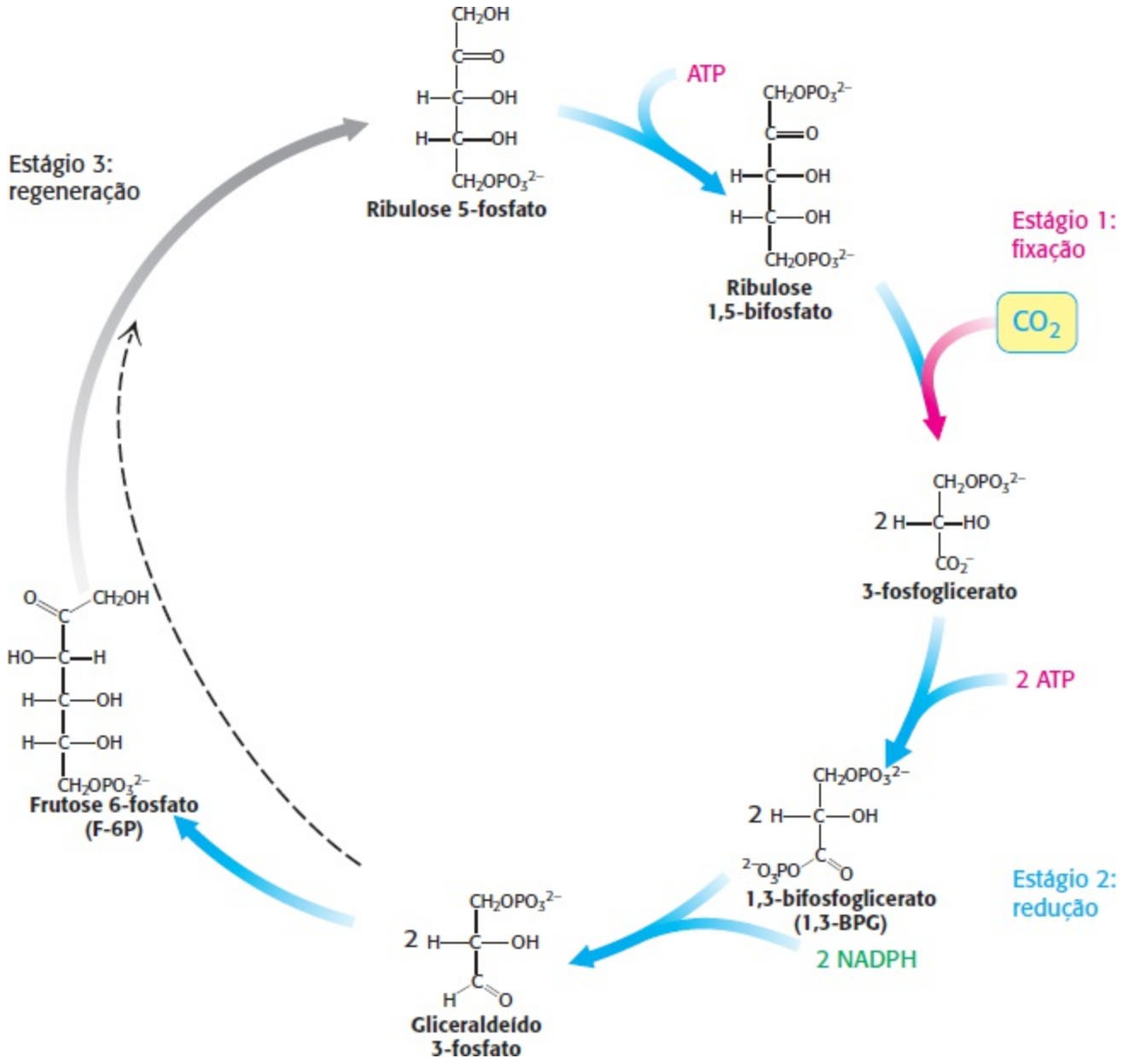


Figura 20.1 Ciclo de Calvin. O ciclo de Calvin consiste em três estágios. O Estágio 1 é a fixação de carbono pela carboxilação da ribulose 1,5-bifosfato. O Estágio 2 é a redução do carbono fixado para iniciar a síntese de hexose. O Estágio 3 é a regeneração do composto inicial, a ribulose 1,5-bifosfato.

1. A fixação do CO_2 pela ribulose 1,5-bifosfato, formando duas moléculas de 3-fosfoglicerato;

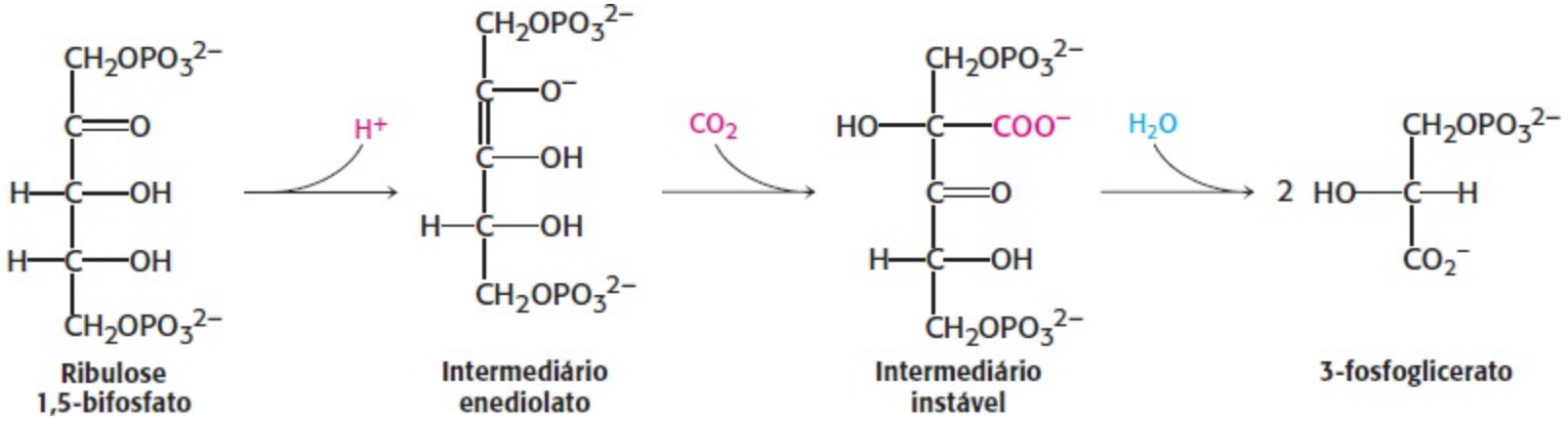
2. A redução do 3-fosfoglicerato para formar hexoses; e

3. A regeneração da ribulose 1,5-bifosfato, de modo que mais CO_2 possa ser fixado.

Esse conjunto de reações ocorre no estroma dos cloroplastos, as organelas da fotossíntese.

O dióxido de carbono reage com a ribulose 1,5-bifosfato, formando duas moléculas de 3-fosfoglicerato

A primeira etapa do ciclo de Calvin consiste na fixação do CO_2. Essa etapa começa com a conversão da ribulose 1,5-bifosfato em um intermediário enediol altamente reativo. A molécula de CO_2 condensa-se com o intermediário enediol, formando um composto instável de seis carbonos, que é rapidamente hidrolisado a duas moléculas de 3-fosfoglicerato.



Essa reação altamente exergônica [$\Delta G^{o'} = -51{,}9$ kJ mol^{-1} (–12,4 kcal mol^{-1})] é catalisada pela *ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase* (habitualmente denominada *rubisco*), uma enzima localizada na superfície do estroma das membranas tilacoides dos cloroplastos. Essa reação importante constitui a etapa limitante da síntese de hexoses. A rubisco nos cloroplastos é constituída de oito subunidades grandes (L, 55 kDa) e oito pequenas (S, 13 kDa) (Figura 20.2). Cada cadeia L contém um sítio catalítico e um sítio regulatório. As cadeias S intensificam a atividade catalítica das cadeias L. Essa enzima é abundante nos cloroplastos, e é responsável por aproximadamente 30% da proteína total das folhas em algumas plantas. Com efeito, a rubisco é a enzima, e provavelmente também a proteína, mais abundante na biosfera. Por ser uma enzima lenta, a rubisco está presente em grandes quantidades; a sua velocidade catalítica máxima é de apenas 3 s^{-1}.

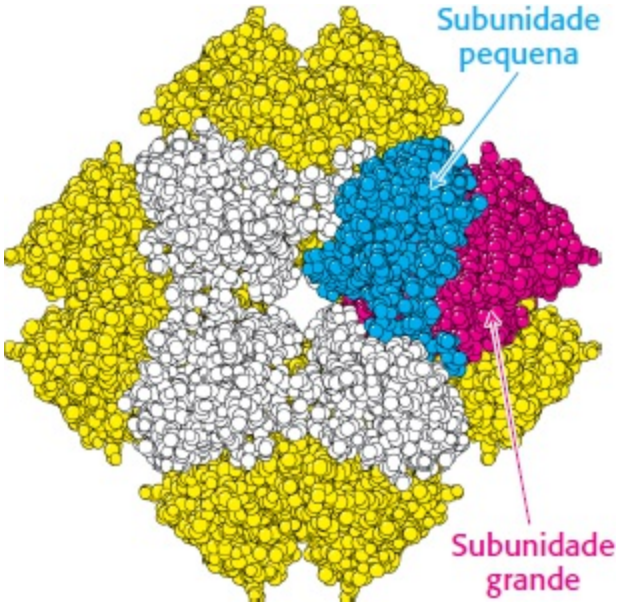
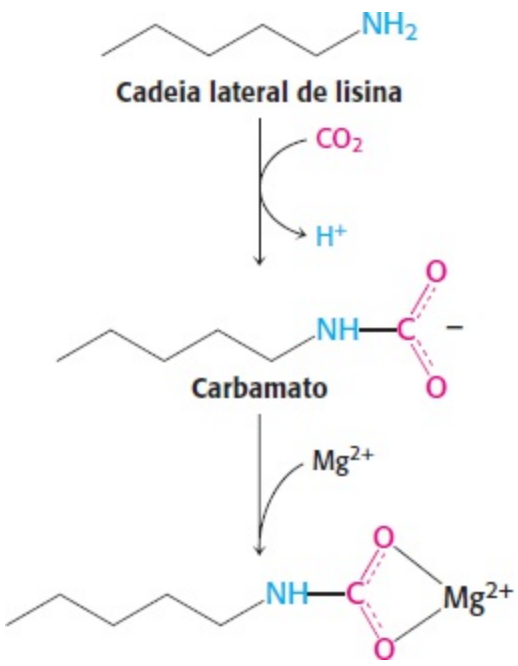


Figura 20.2 Estrutura da rubisco. A enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) é constituída de oito subunidades grandes (uma delas mostrada em vermelho e as outras em amarelo) e oito subunidades pequenas (uma delas em azul, e as outras em branco). Os sítios ativos encontram-se nas subunidades grandes. [Desenhada de 1RXO.pdb.]



A atividade da rubisco depende de magnésio e de carbamato

A atividade da rubisco depende da sua ligação a um íon metálico divalente, habitualmente o íon magnésio. À semelhança do íon zinco no sítio ativo da anidrase carbônica (Seção 9.2), esse íon metálico serve para ativar uma molécula de substrato ligado estabilizando uma carga negativa. É interessante observar que uma molécula de CO_2, além do substrato, é necessária para completar a montagem do sítio de ligação do Mg^{2+} na rubisco. Essa molécula de CO_2 é acrescentada ao grupo ε-amino sem carga da lisina 201, formando um *carbamato*. Em seguida, esse produto de adição de carga negativa liga-se ao íon Mg^{2+}. A formação do carbamato é facilitada pela enzima *rubisco ativase*, embora ele também seja formado espontaneamente em uma velocidade menor.

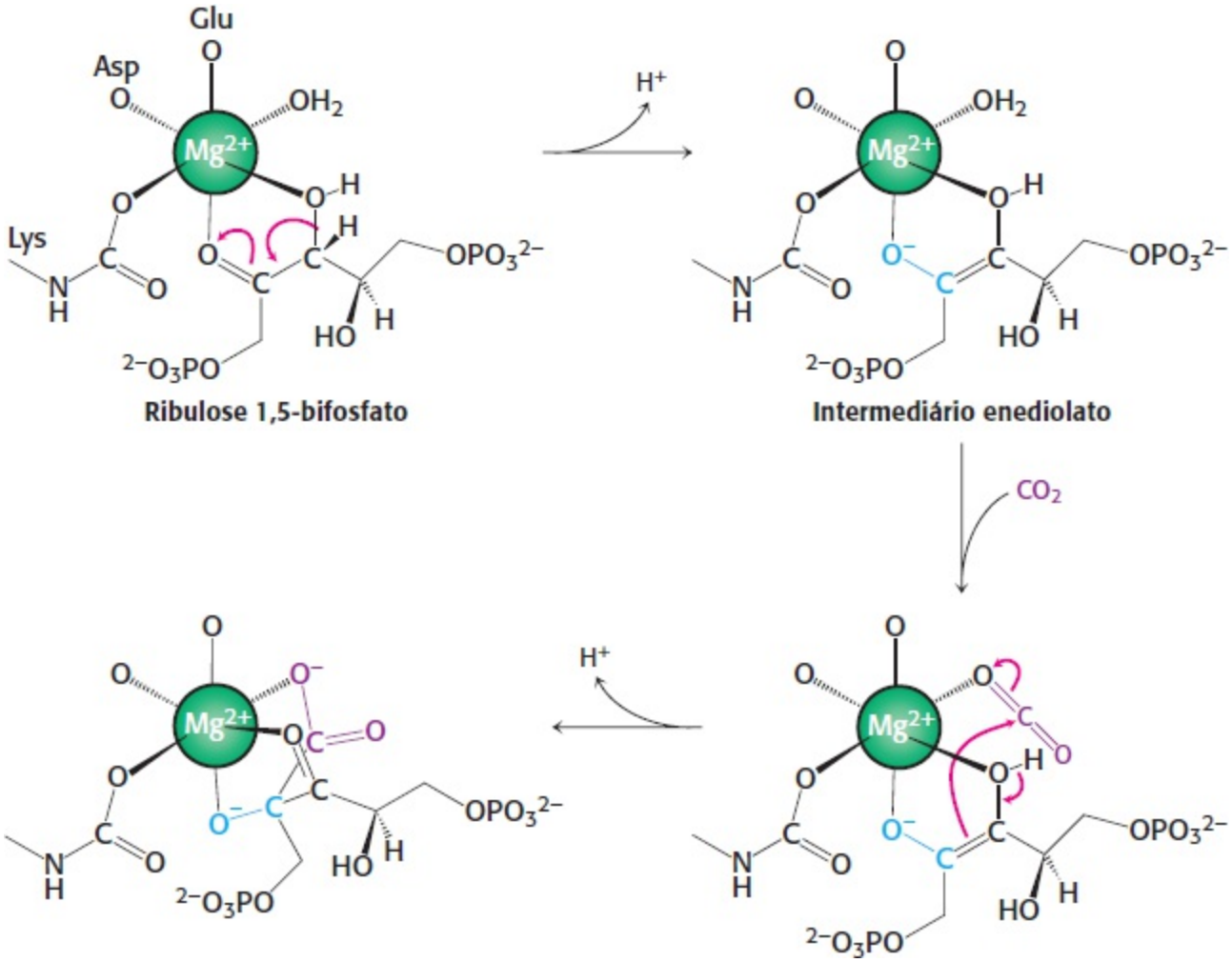


Figura 20.3 Papel do íon magnésio no mecanismo da rubisco. A ribulose 1,5-bifosfato liga-se a um íon magnésio que está ligado à rubisco por meio de um resíduo de glutamato, um resíduo de aspartato e o carbamato de lisina. A ribulose 1,5-bifosfato coordenada perde um próton para formar a espécie reativa enediolato, que reage com CO_2 para formar uma nova ligação carbono-carbono.

O centro metálico desempenha um papel essencial na ligação da ribulose 1,5-bifosfato e na sua ativação para reagir com o CO_2 (Figura 20.3). A ribulose 1,5-bifosfato liga-se ao Mg^{2+} pelo seu grupo ceto e por um grupo hidroxila adjacente. Esse complexo é imediatamente desprotonado para formar um intermediário enediolato. Essa espécie reativa, análoga à espécie de hidróxido de zinco na anidrase carbônica, acopla-se ao CO_2, produzindo a nova ligação carbono-carbono. O produto resultante é coordenado ao íon Mg^{2+} por meio de três grupos, incluindo o carboxilato recém-formado. Em seguida, uma molécula de H_2O é acrescentada a esse β-cetoácido, formando um intermediário que sofre clivagem, originando duas moléculas de 3-fosfoglicerato (Figura 20.4).

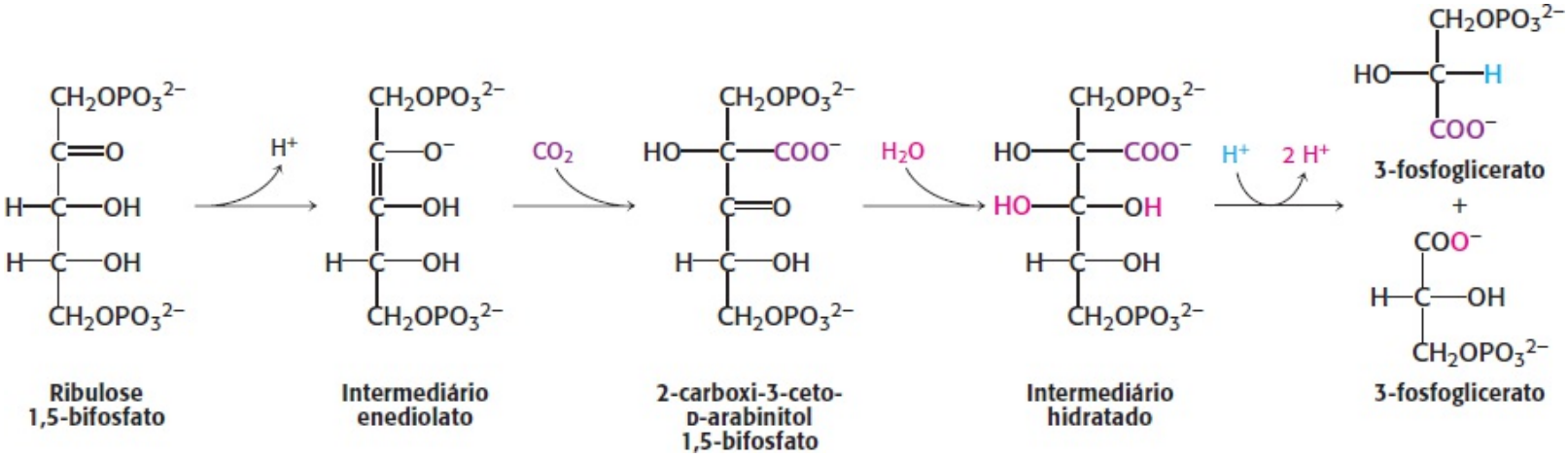


Figura 20.4 Formação do 3-fosfoglicerato. A via global para a conversão da ribulose 1,5-bifosfato e do CO_2 em duas moléculas de 3-fosfoglicerato. Embora sejam mostradas as espécies livres, essas etapas ocorrem sobre o íon magnésio.

A rubisco também catalisa uma reação de desperdício de oxigenase | A imperfeição catalítica

O intermediário reativo produzido sobre o íon Mg^{2+} algumas vezes reage com o O_2 em lugar do CO_2. Por conseguinte, a rubisco também catalisa uma reação deletéria de oxigenase. Os produtos dessa reação são o *fosfoglicolato* e o *3-fosfoglicerato* (Figura 20.5). A velocidade da reação da carboxilase é quatro vezes a da reação da oxigenase em condições atmosféricas normais a 25°C; a concentração de CO_2 no estroma é então de 10 μM, e a do O_2, de 250 μM. A reação de oxigenase, à semelhança da reação de carboxilase, requer que a lisina 201 esteja na forma de carbamato. Como esse carbamato só é formado na presença de CO_2, a rubisco é impedida de catalisar exclusivamente a reação de oxigenase na ausência de CO_2.

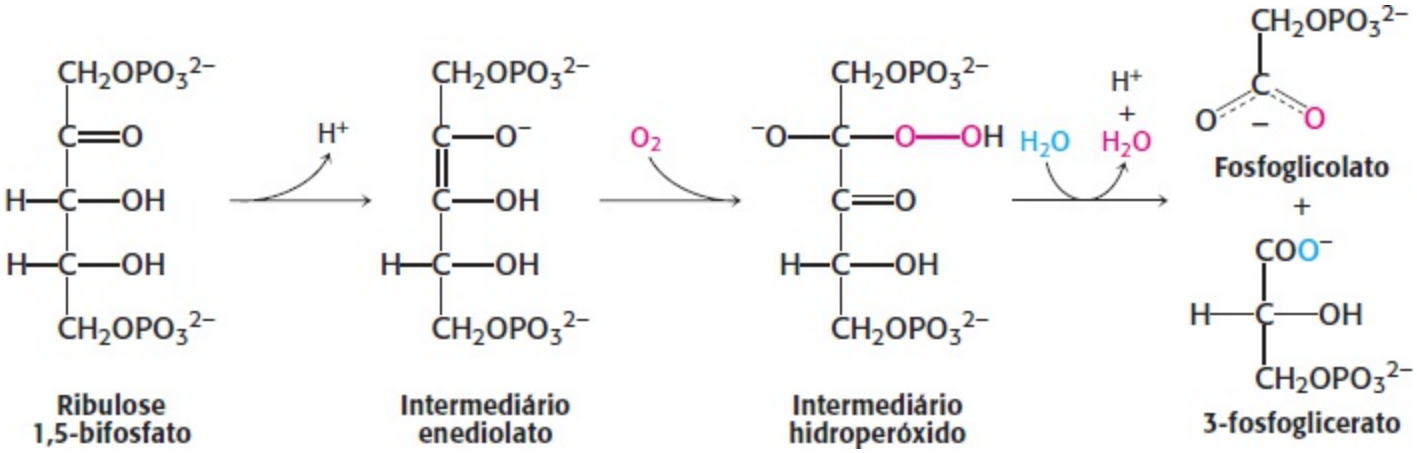


Figura 20.5 Uma reação colateral de desperdício. O intermediário enediolato reativo na rubisco também reage com oxigênio molecular, formando um intermediário hidroperóxido, que prossegue formando uma molécula de 3-fosfoglicerato e uma de fosfoglicolato.

O fosfoglicolato não é um metabólito versátil. Uma via de recuperação recupera parte de seu esqueleto de carbono (Figura 20.6). Uma fosfatase específica converte o fosfoglicolato em *glicolato,* que penetra nos *peroxissomos* (também denominados *microcorpos;* Figura 20.7). Em seguida, o glicolato é oxidado a *glioxilato* pela glicolato oxidase, uma enzima com grupo prostético de flavina mononucleotídio. O H_2O_2 produzido nessa reação é clivado pela catalase a H_2O_2 e O_2. A transaminação do glioxilato produz então *glicina.* Duas moléculas de glicina podem unir-se para

formar serina, um precursor potencial da glicose, com liberação de CO_2 e íon amônio (NH_4^+). O íon amônio, que é utilizado na síntese de compostos contendo nitrogênio, é recuperado pela reação da glutamina sintetase (Figura 20.6; ver Seção 23.3).

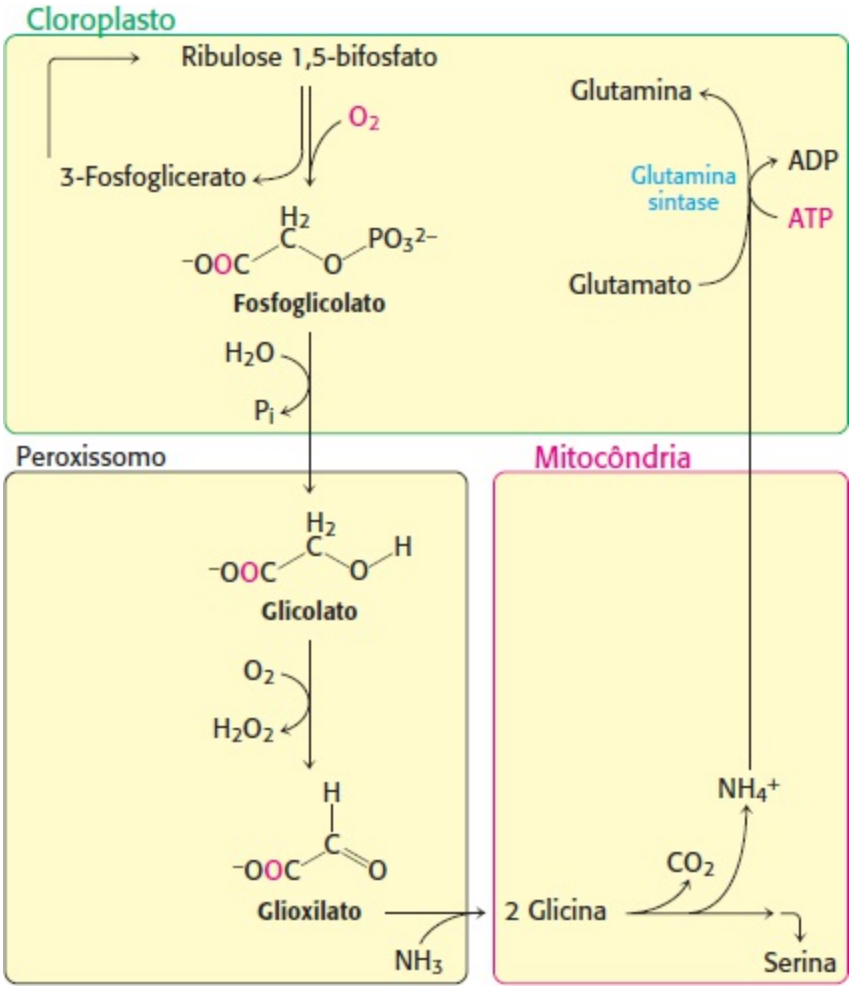


Figura 20.6 Reações de fotorrespiração. Fosfoglicolato é formado como produto da reação de oxigenase nos cloroplastos. Após a desfosforilação, o glicolato é transportado para os peroxissomos, onde é convertido em glioxilato e, a seguir, em glicina. Nas mitocôndrias, duas glicinas transformam-se em serina após a perda de um carbono na forma de CO_2 e um íon amônio. O íon amônio é recuperado nos cloroplastos.

Figura 20.7 Micrografia eletrônica de um peroxissomo entre dois cloroplastos. [Cortesia da Dra. Sue Ellen Frederick.]

Essa via de recuperação serve para reciclar três dos quatro átomos de carbono de duas moléculas de glicolato. Entretanto, um átomo de carbono é perdido como CO_2. Esse processo é denominado *fotorrespiração*, devido ao consumo de O_2 e à liberação de CO_2, e representa um desperdício, visto que um carbono orgânico é convertido em CO_2, sem produção de ATP, NADPH ou outro metabólito rico em energia. A fotorrespiração é responsável pela perda de até 25% do carbono fixado. Os processos evolutivos presumivelmente aumentaram a preferência da rubisco pela carboxilação. Por exemplo, a rubisco das plantas superiores é oito vezes mais específica para a carboxilação do que a das bactérias fotossintéticas.

Muitas pesquisas foram realizadas com o objetivo de produzir formas recombinantes de rubisco capazes de apresentar atividade de oxigenase reduzida, porém todas essas tentativas fracassaram. Isso suscitou a seguinte questão: qual é a base bioquímica dessa ineficiência? Os estudos estruturais realizados mostram que, quando o intermediário enediol reativo é formado, ocorre fechamento de alças (voltas) sobre o sítio ativo para proteger o enediol. Um canal para o meio ambiente é mantido para possibilitar o acesso ao CO_2; entretanto, como o CO_2, o O_2 é uma molécula linear que também se encaixa no canal. Em essência, o problema não reside na enzima, e sim na estrutura notável do CO_2. O CO_2 carece de características químicas que poderiam distingui-lo de outros gases, como o O_2, de modo que a atividade de oxigenase da enzima representa uma falha inevitável. Entretanto, também é possível que a atividade de oxigenase não seja uma imperfeição da enzima, e sim apenas mostre o nosso pouco conhecimento sobre o assunto. Talvez a atividade de oxigenase possa desempenhar um papel bioquimicamente importante que ainda não foi identificado.

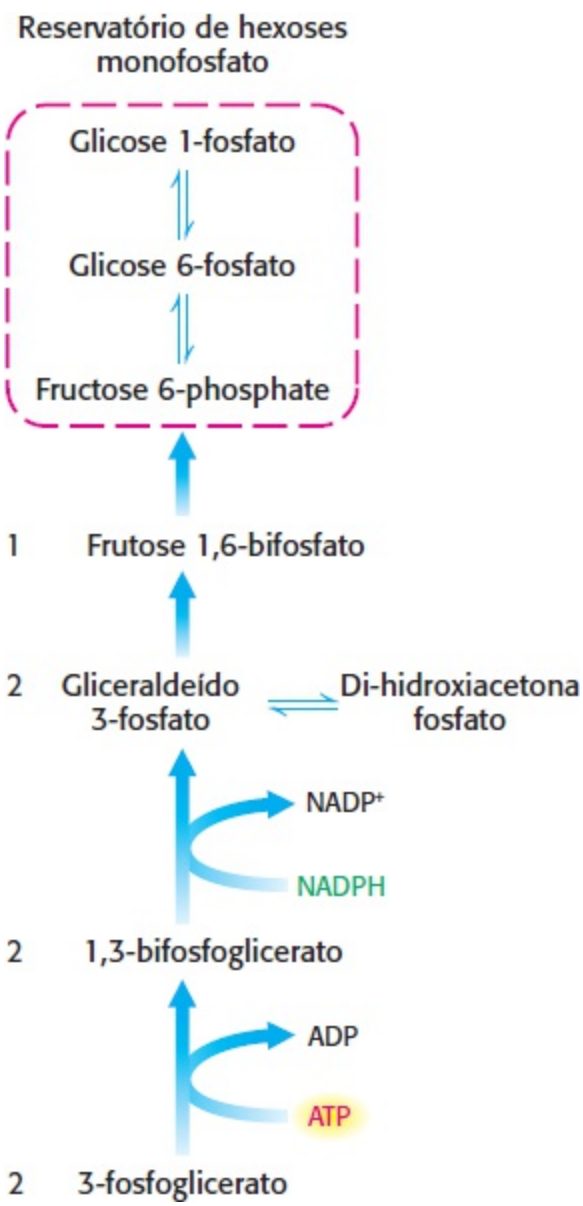


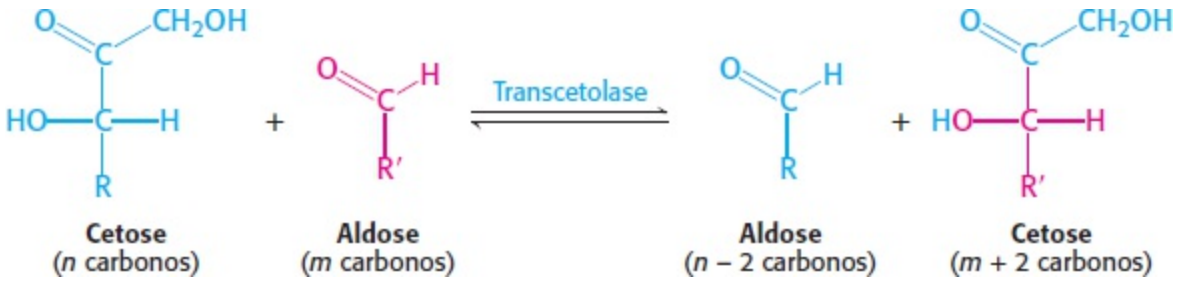
Figura 20.8 Formação de hexose fosfato. O 3-fosfoglicerato é convertido em frutose 6-fosfato, em uma via paralela à da gliconeogênese.

As hexoses fosfato são produzidas a partir do fosfoglicerato, e a ribulose 1,5-bifosfato é regenerada

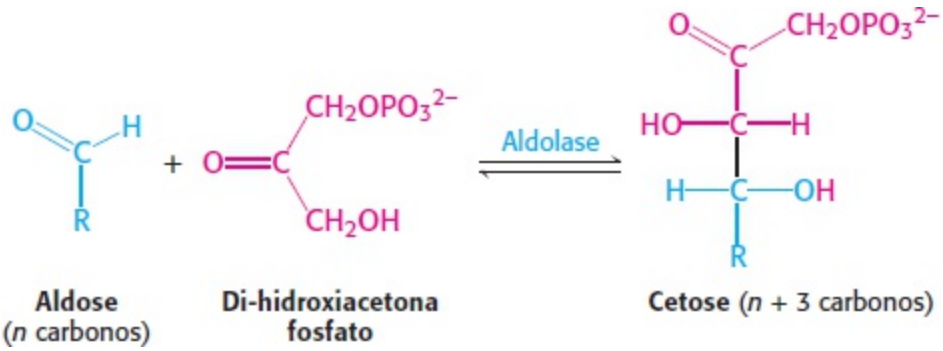
O produto da rubisco, o 3-fosfoglicerato, é convertido, a seguir, em frutose 6-fosfato, que prontamente se isomeriza em glicose 1-fosfato e glicose 6-fosfato. A mistura das três hexoses fosforiladas é denominada *reservatório de hexoses monofosfato.* As etapas nessa conversão (Figura 20.8) são iguais à da gliconeogênese (ver Figura 16.24), exceto que a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase nos cloroplastos, que gera gliceraldeído 3-fosfato (GAP), é específica para o NADPH, e não para o NADH. Essas reações e aquelas catalisadas pela rubisco levam o CO_2 ao nível de uma hexose, convertendo o CO_2 em um combustível químico à custa de NADPH e ATP produzidos nas reações de luz.

A terceira fase do ciclo de Calvin consiste na regeneração da ribulose 1,5-bifosfato, o aceptor de CO_2 na primeira etapa. O problema é construir um açúcar de cinco carbonos a partir de açúcares de seis e de três carbonos. Uma transcetolase e uma aldolase desempenham o papel principal no rearranjo dos átomos de carbono. A *transcetolase,* que veremos novamente na via das pentoses fosfato, requer a presença da coenzima tiamina pirofosfato (TPP) para transferir uma unidade de dois

carbonos (CO–CH_2OH) de uma cetose para uma aldose.



A *aldolase*, que já encontramos na glicólise (Seção 16.1), catalisa uma condensação de aldol entre a di-hidroxiacetona fosfato (DHAP) e um aldeído. Essa enzima é altamente específica para a di-hidroxiacetona fosfato, porém aceita uma ampla variedade de aldeídos.



Com essas enzimas, a construção do açúcar de cinco carbonos prossegue como mostra a Figura 20.9.

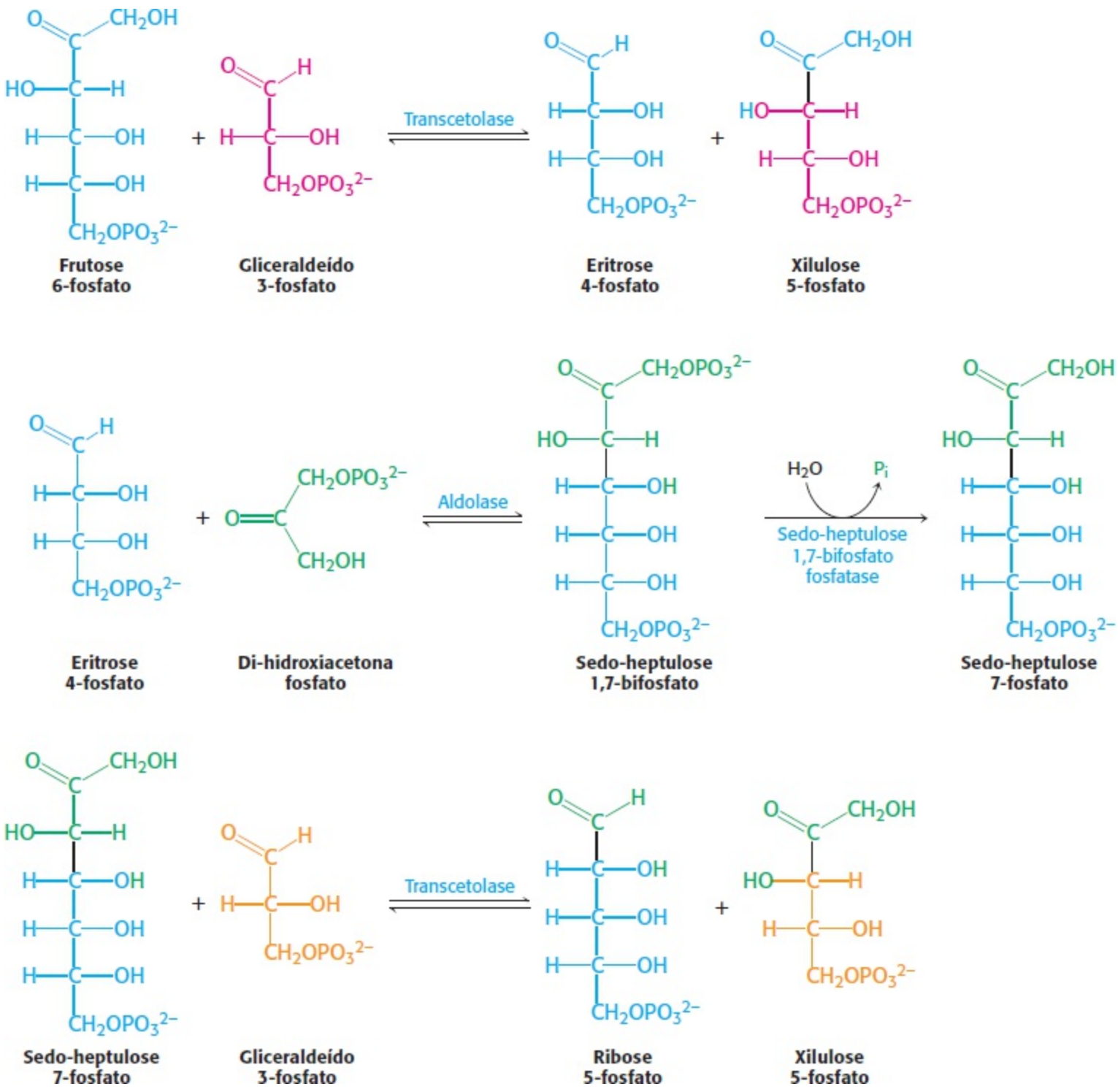


Figura 20.9 Formação de açúcares de cinco carbonos. Em primeiro lugar, a transcetolase converte um açúcar de seis carbonos e um açúcar de três carbonos em um açúcar de quatro carbonos e um açúcar de cinco carbonos. Em seguida, a aldolase combina o produto de quatro carbonos com um açúcar de três carbonos para formar um açúcar de sete carbonos. Por fim, esse açúcar de setes carbonos reage com outro açúcar de três carbonos para formar dois açúcares adicionais de cinco carbonos.

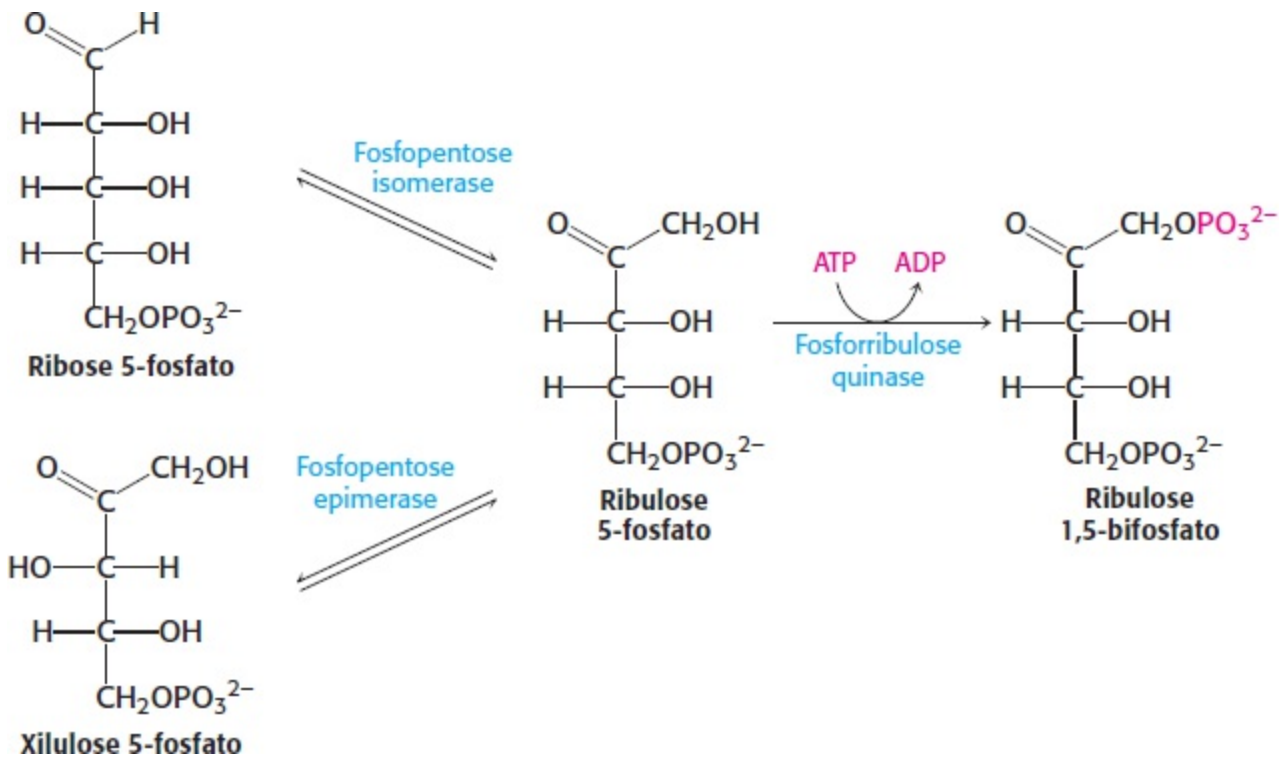


Figura 20.10 Regeneração da ribulose 1,5-bifosfato. Tanto a ribose 5-fosfato quanto a xilulose 5-fosfato são convertidas em ribulose 5-fosfato, que é então fosforilada para completar a regeneração da ribulose 1,5-bifosfato.

Por fim, a ribose 5-fosfato é convertida em ribulose 5-fosfato pela *fosfopentose isomerase,* enquanto a xilulose 5-fosfato é transformada em ribulose 5-fosfato pela *fosfopentose epimerase.* A ribulose 5-fosfato é convertida em ribulose 1,5-bifosfato pela ação da *fosforribulose quinase* (Figura 20.10). A soma dessas reações é

Frutose 6-fosfato + 2 gliceraldeído 3-fosfato

+ di-hidroxiacetona fosfato + 3 ATP →

3 ribulose 1,5-bifosfato + 3 ADP

Essa série de reações completa o ciclo de Calvin (Figura 20.11). A Figura 20.11 mostra as reações necessárias com a estequiometria apropriada para converter três moléculas de CO_2 em uma molécula de di-hidroxiacetona fosfato (DHAP). Entretanto, são necessárias duas moléculas de DHAP para a síntese de um membro do reservatório de hexoses monofosfato. Consequentemente, o ciclo, como ele é apresentado, precisa ocorrer duas vezes para produzir uma hexose monofosfato. O resultado do ciclo de Calvin consiste na produção de uma hexose e na regeneração do composto inicial, a ribulose 1,5-bifosfato. Em essência, a ribulose 1,5-bifosfato atua de modo catalítico, à semelhança do oxaloacetato no ciclo do ácido cítrico.

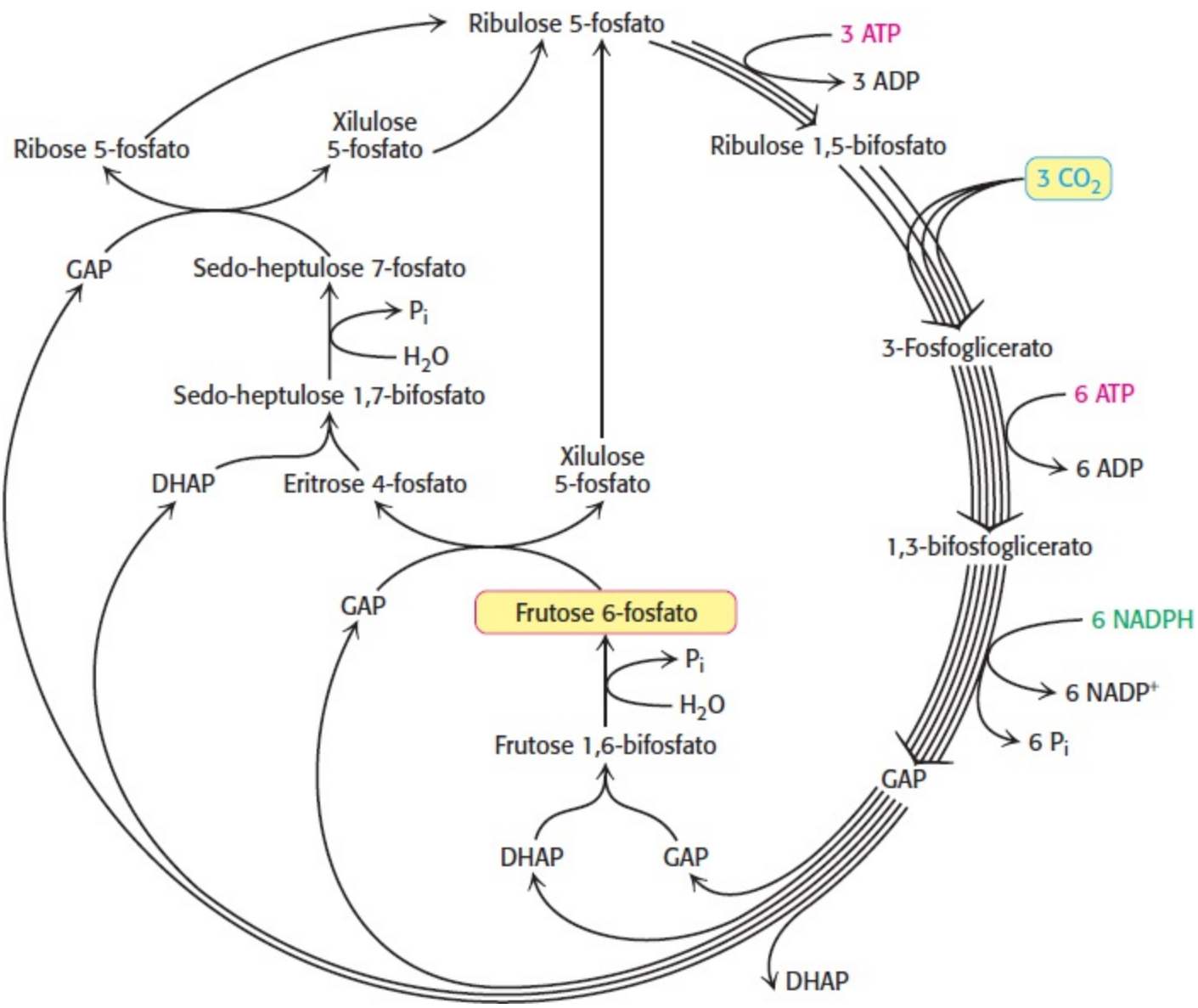


Figura 20.11 Ciclo de Calvin. O esquema mostra as reações necessárias com a estequiometria correta para converter três moléculas de CO_2 em uma molécula de di-hidroxiacetona fosfato (DHAP). O ciclo não é tão simples como aquele apresentado na Figura 20.1; na verdade, ocorrem muitas reações que levam finalmente à síntese de glicose e à regeneração da ribulose 1,5-bifosfato. [De J. R. Bowyer and R. C. Leegood. "Phtosynthesis", in *Plant Biochemistry,* P. M. Dey and J. B. Harborne, Eds. (Academic Press, 1997), p.85.]

São utilizadas três moléculas de ATP e duas de NADPH para levar o dióxido de carbono ao nível de uma hexose

Qual é o gasto energético para a síntese de uma hexose? São necessários seis giros do ciclo de Calvin, visto que um átomo de carbono é reduzido em cada giro. São consumidas 12 moléculas de ATP na fosforilação de 12 moléculas de 3-fosfoglicerato a 1,3-bifosfoglicerato, e são consumidas 12 moléculas de NADPH na redução de 12 moléculas de 1,3-bifosfoglicerato a gliceraldeído 3-fosfato. Seis moléculas adicionais de ATP são gastas na regeneração da ribulose 1,5-bifosfato.

Podemos agora escrever uma equação balanceada para a reação final do ciclo de Calvin:

$$6\,CO_2 + 18\,ATP + 12\,NADPH + 12\,H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 18\,ADP + 18\,P_i + 12\,NADP^+ + 6\,H^+$$

Por conseguinte, são consumidas três moléculas de ATP e duas moléculas de NADPH na

incorporação de uma única molécula de CO_2 em uma hexose, como a glicose ou a frutose.

O amido e a sacarose constituem as principais reservas de carboidratos nas plantas

Qual é o destino dos membros do reservatório de hexoses monofosfato? Essas moléculas são utilizadas de diversas maneiras, porém desempenham dois papéis principais. As plantas contêm duas formas principais de armazenamento de açúcar: o *amido* e a *sacarose*. O amido, como o seu correspondente em animais, o glicogênio, é um polímero de resíduos de glicose, porém menos ramificado do que o glicogênio, pois contém uma menor proporção de ligações glicosídicas α-1,6 (Seção 11.2). Outra diferença é que a ADP-glicose, e não a UDP-glicose, constitui o precursor ativado. O amido é sintetizado e armazenado nos cloroplastos.

Por outro lado, a sacarose (o açúcar comum de mesa), um dissacarídio, é sintetizada no citoplasma. As plantas carecem da capacidade de transportar as hexoses fosfato através da membrana do cloroplasto, porém são capazes de transportar *trioses* fosfato dos cloroplastos para o citoplasma. Os intermediários de triose fosfato, como o gliceraldeído 3-fosfato, atravessam o citoplasma em troca de fosfato por meio da ação de um translocador de fosfato presente em grandes quantidades. A frutose 6-fosfato formada a partir de trioses fosfato une-se à unidade de glicose da UDP-glicose para formar sacarose 6-fosfato (Figura 20.12). A hidrólise do éster fosfato produz sacarose, um açúcar prontamente transportável e mobilizável, que é armazenado em muitas células vegetais, como na beterraba e na cana-de-açúcar.

20.2 A atividade do ciclo de Calvin depende das condições ambientais

Como as reações de luz comunicam-se com as reações de obscuridade para regular esse processo fundamental de fixação de CO_2 em biomoléculas? *O principal meio de regulação consiste na alteração do ambiente do estroma pelas reações de luz.* As reações de luz provocam aumento do pH e das concentrações de Mg^{2+}, NADPH e ferredoxina reduzida no estroma, contribuindo, assim, para a ativação de certas enzimas do ciclo de Calvin (Figura 20.13).

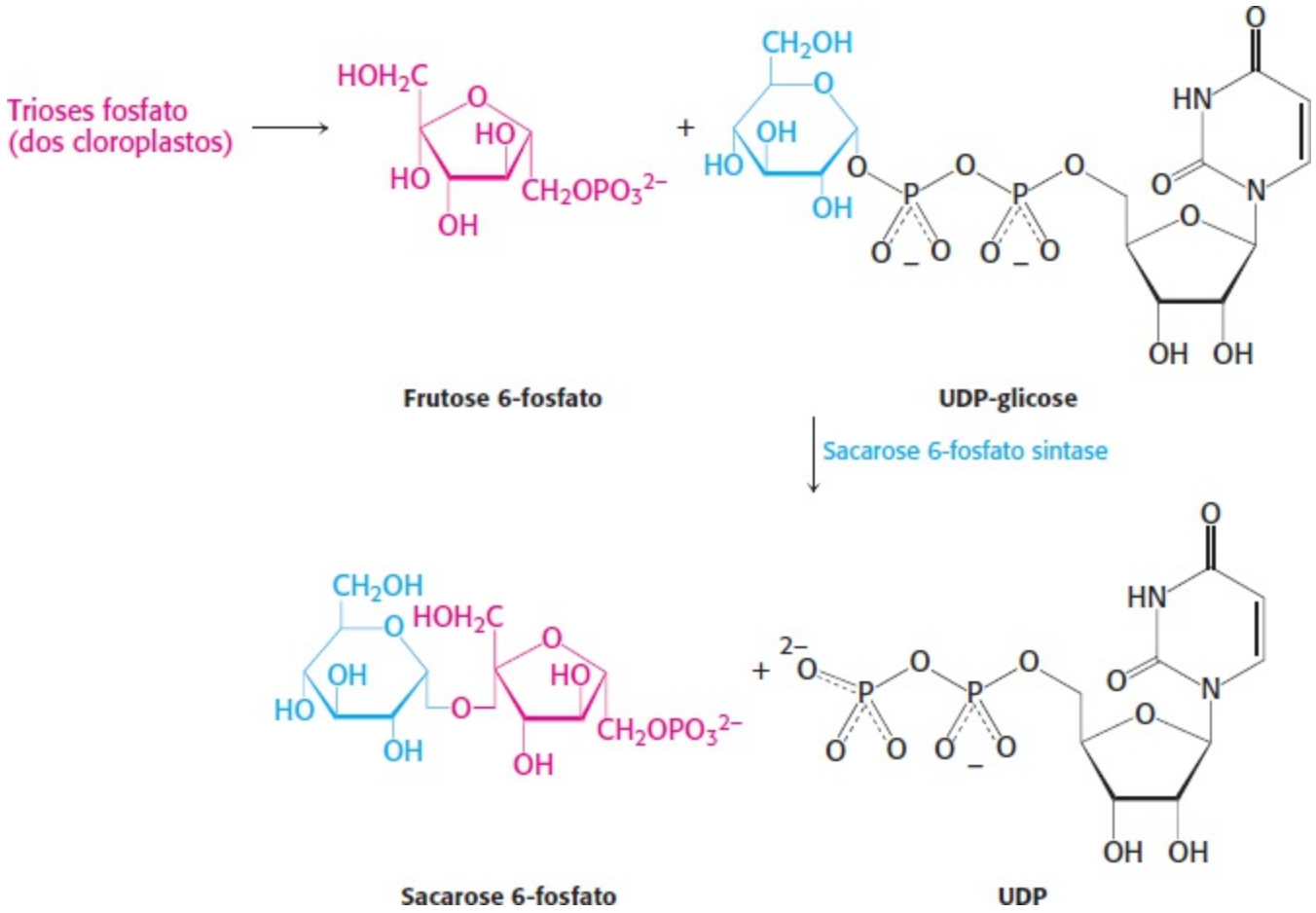


Figura 20.12 Síntese da sacarose. A sacarose 6-fosfato é formada pela reação entre a frutose 6-fosfato e o intermediário ativado, a uridina difosfato glicose (UDP-glicose).

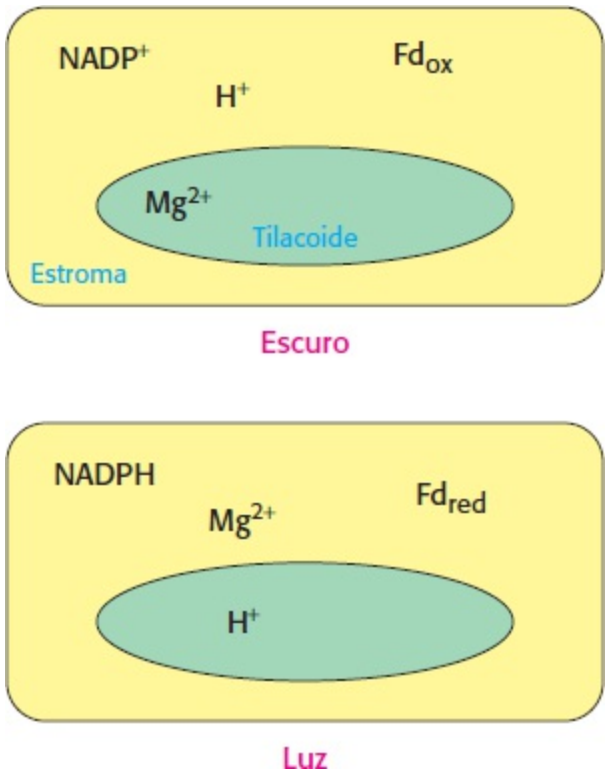


Figura 20.13 Regulação do ciclo de Calvin pela luz. As reações de luz da fotossíntese transferem elétrons para fora do lúmen do tilacoide para o estroma e transferem prótons do estroma para o lúmen do tilacoide. Em consequência desses processos, as concentrações de NADPH, de ferredoxina (Fd) reduzida e de Mg^{2+} no estroma são mais elevadas na luz do que no escuro, enquanto a concentração de H^+ é mais baixa no escuro. Cada uma dessas mudanças de concentração ajuda a acoplar as reações do ciclo de Calvin com as reações de luz.

A rubisco é ativada por mudanças nas concentrações de prótons e de íons magnésio impulsionadas pela luz

Conforme assinalado anteriormente, a etapa limitante da velocidade do ciclo de Calvin é a carboxilação da ribulose 1,5-bifosfato para formar duas moléculas de 3-fosfoglicerato. *A atividade da rubisco aumenta acentuadamente com a iluminação, visto que a luz facilita a formação de carbamato necessária para a atividade da enzima.* No estroma, o pH aumenta de 7 para 8, e ocorre uma elevação do nível de Mg^{2+}. Ambos os efeitos são consequências do bombeamento de prótons impulsionado pela luz para dentro do espaço do tilacoide. Os íons Mg^{2+} do espaço do tilacoide são liberados no estroma para compensar o influxo de prótons. A formação de carbamato é favorecida na presença de pH alcalino. O CO_2 é adicionado a uma forma desprotonada da lisina 201 da rubisco, e o íon Mg^{2+} liga-se ao carbamato para produzir a forma ativa da enzima. Por conseguinte, a luz promove a geração de sinais reguladores, bem como de ATP e NADPH.

A tiorredoxina desempenha um papel essencial na regulação do ciclo de Calvin

As reações impulsionadas pela luz levam à transferência de elétrons da água para a ferredoxina e, por fim, para o NADPH. A presença de ferredoxina reduzida e NADPH constituem bons sinais de que as condições são favoráveis para a biossíntese. Uma maneira pela qual essa informação é transmitida para as enzimas de biossíntese é pela *tiorredoxina,* uma proteína de 12 kDa que contém resíduos de cisteína adjacentes que se alternam entre formas com sulfidrilas reduzidas e formas com dissulfetos oxidados (Figura 20.14). A forma reduzida da tiorredoxina ativa muitas enzimas de biossíntese ao reduzir as pontes de dissulfeto que controlam sua atividade e inibe várias enzimas de degradação pelo mesmo mecanismo (Tabela 20.1). Nos cloroplastos, a tiorredoxina oxidada é reduzida pela ferredoxina, em uma reação catalisada pela *ferredoxina-tiorredoxina redutase.* Essa enzima contém um aglomerado 4Fe-4S que acopla duas oxidações de um elétron da ferredoxina reduzida com a redução de dois elétrons da tiorredoxina. Por conseguinte, *as atividades das reações de luz e de obscuridade da fotossíntese são coordenadas por meio da transferência de elétrons da ferredoxina reduzida para a tiorredoxina e, a seguir, para enzimas componentes contendo pontes de dissulfeto reguladoras* (Figura 20.15). Retornaremos à tiorredoxina quando considerarmos a redução dos ribonucleotídios (Seção 25.3).

Tabela 20.1 Enzimas reguladas pela tiorredoxina.

Enzima	Via
Rubisco	Fixação do carbono no ciclo de Calvin
Frutose 1,6-bifosfato	Gliconeogênese
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	Ciclo de Calvin, gliconeogênese, glicólise
Sedo-heptulose 1,7-bifosfatase	Ciclo de Calvin
Glicose 6-fosfato desidrogenase	Via das pentoses fosfato
Fenilalanina amônia liase	Síntese de lignina

Fosforribulose quinase	Ciclo de Calvin
NADP+ malato desidrogenase	Via C_4

Figura 20.14 Tiorredoxina. A forma oxidada da tiorredoxina contém uma ponte de dissulfeto. Quando a tiorredoxina é reduzida pela ferredoxina reduzida, a ponte dissulfeto é convertida em dois grupos sulfidrila livres. A tiorredoxina reduzida pode clivar pontes dissulfeto em enzimas, ativando certas enzimas do ciclo de Calvin e inativando algumas enzimas de degradação. [Desenhada de 1F9M.pdb.]

O NADPH é uma molécula sinalizadora que ativa duas enzimas de biossíntese, a fosforribulose quinase e a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. No escuro, essas enzimas são inibidas pela associação a uma proteína de 8,5 kDa, denominada CP12. O NADPH rompe essa associação, com consequente liberação das enzimas ativas.

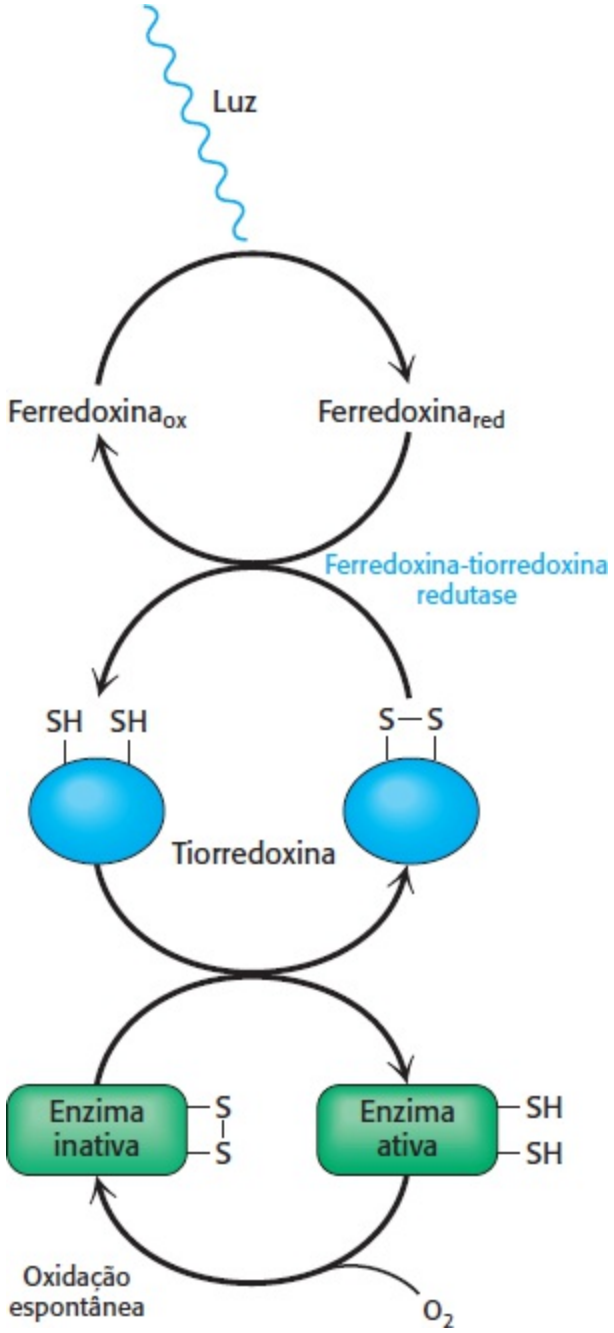


Figura 20.15 Ativação enzimática pela tiorredoxina. A tiorredoxina reduzida ativa certas enzimas do ciclo de Calvin ao clivar pontes dissulfeto reguladoras.

A via C_4 de plantas tropicais acelera a fotossíntese ao concentrar o dióxido de carbono

A atividade de oxigenase da rubisco representa um desafio bioquímico para as plantas tropicais, visto que essa atividade aumenta mais rapidamente com a temperatura do que a sua atividade de carboxilase. Como então os vegetais como a cana-de-açúcar, que crescem em climas quentes, evitam taxas muito altas de fotorrespiração desperdiçadora? A solução para esse problema é conseguir uma concentração alta de CO_2 no local do ciclo de Calvin nas suas células fotossintéticas. A essência desse processo, elucidada por Marshall Davidson Hatch e C. Roger Slack, é que *compostos de quatro carbonos (C_4), como o oxaloacetato e o malato, transportam o CO_2 das células do mesofilo, que estão em contato com o ar, para as células da bainha dos feixes, que constituem os principais locais de fotossíntese* (Figura 20.16). A descarboxilação do composto de quatro carbonos na célula da bainha dos feixes mantém uma alta concentração de CO_2 no local do ciclo de Calvin. O produto de três carbonos retorna à célula mesófila para outro ciclo de carboxilação.

A *via* C_4 para o transporte de CO_2 começa em uma célula mesófila com a condensação de CO_2 e fosfoenolpiruvato para formar *oxaloacetato,* em uma reação catalisada pela *fosfoenolpiruvato carboxilase.* Em algumas espécies, o oxaloacetato é transformado em *malato* por uma malato desidrogenase ligada a $NADP^+$. O malato penetra na célula da bainha do feixe e sofre descarboxilação oxidativa no interior dos cloroplastos por uma malato desidrogenase ligada a $NADP^+$. O CO_2 liberado entra no ciclo de Calvin da maneira habitual pela sua condensação com ribulose 1,5-bifosfato. O piruvato formado nessa região de descarboxilação retorna à célula mesófila. Por fim, ocorre formação de fosfoenolpiruvato a partir do piruvato pela *piruvato-P_i diquinase.*

A reação final dessa via C_4 é

$$CO_2 \text{ (na célula mesófila)} + ATP + 2\ H_2O \rightarrow CO_2 \text{ (na célula da bainha do feixe)} + AMP + 2\ P_i + 2\ H^+$$

Por conseguinte, *o equivalente energético de duas moléculas de ATP é consumido no transporte de CO_2 para os cloroplastos das células da bainha do feixe.* Em essência, esse processo consiste em transporte ativo: o bombeamento de CO_2 para dentro das células da bainha do feixe é impulsionado pela hidrólise de uma molécula de ATP para uma molécula de AMP e duas moléculas de ortofosfato. A concentração de CO_2 pode ser 20 vezes maior nas células da bainha do feixe do que nas células do mesofilo.

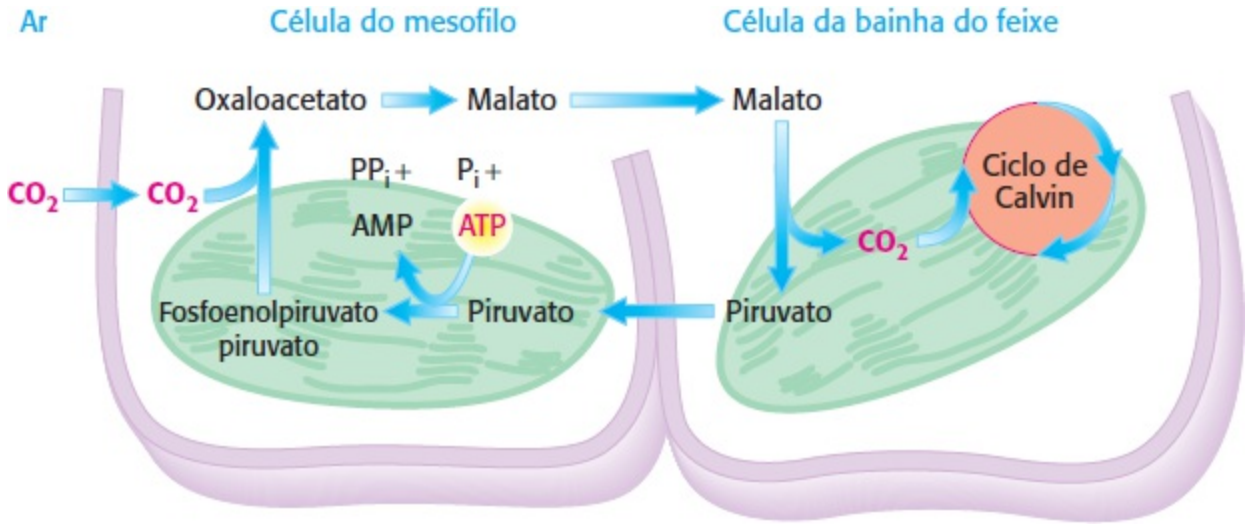


Figura 20.16 Via de C_4. O dióxido de carbono é concentrado nas células da bainha do feixe pelo consumo de ATP nas células do mesofilo.

Quando a via de C_4 e o ciclo de Calvin operam juntos, a reação final é

$$6\ CO_2 + 30\ ATP + 12\ NADPH + 24\ H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 30\ ADP + 30\ P_i + 12\ NADP^+ + 18\ H^+$$

Observe que são consumidas 30 moléculas de ATP por molécula de hexose formada quando a via de C_4 libera CO_2 para o ciclo de Calvin, em contraste com 18 moléculas de ATP por molécula de hexose na ausência da via de C_4. A alta concentração de CO_2 nas células da bainha do feixe das plantas C_4, que é produzida pelo consumo adicional de 12 moléculas de ATP, é crítica para a alta velocidade de

fotossíntese, visto que o CO_2 é um fator limitante quando a luz é abundante. Uma alta concentração de CO_2 também minimiza a perda de energia causada pela fotorrespiração.

As plantas tropicais com uma via de C_4 realizam pouca fotorrespiração, visto que a alta concentração de CO_2 em suas células da bainha do feixe acelera a reação de carboxilase em relação a da oxigenase. Esse efeito é particularmente importante em temperaturas mais altas. A distribuição geográfica das plantas que apresentam essa via (plantas C_4) e daquelas que carecem dela (plantas C_3) pode ser agora compreendida em termos moleculares. As *plantas C_4* têm vantagem em um ambiente quente com alta iluminação, o que explica a sua prevalência nos trópicos. As *plantas C_3,* que consomem apenas 18 moléculas de ATP por molécula de hexose formada na ausência de fotorrespiração (em comparação com 30 moléculas de ATP para as plantas C_4), são mais eficientes em temperaturas abaixo de 28°C (aproximadamente) e, portanto, predominam em ambientes temperados.

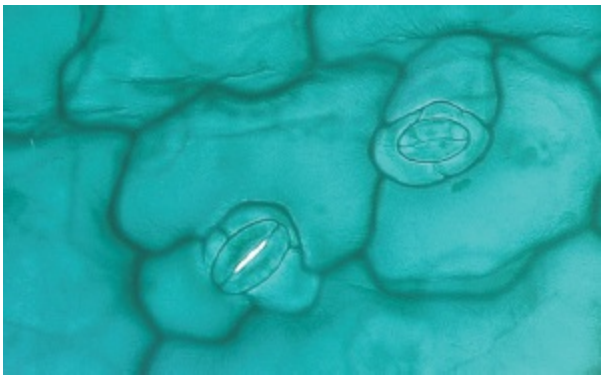


Figura 20.17 Micrografia eletrônica de um estômato aberto e outro fechado. [Herb Charles Ohlmeyer/Fran Heyl Associates.]

A rubisco é encontrada em bactérias, eucariotos e até mesmo *Archaea*, embora outros componentes da fotossíntese não tenham sido encontrados em *Archaea*. Por conseguinte, a rubisco emergiu cedo na evolução, quando a atmosfera era rica em CO_2 e quase desprovida de O_2. A enzima não foi originalmente selecionada para operar em um ambiente como o atual, que é quase desprovido de CO_2 e rico em O_2. A fotorrespiração tornou-se significativa há cerca de 600 milhões de anos, quando a concentração de CO_2 caiu para os níveis atuais. Acredita-se que a via C_4 tenha evoluído em resposta há não mais de 30 milhões de anos e, possivelmente, há apenas 7 milhões de anos. É interessante observar que nenhuma das enzimas é exclusiva das plantas C_4 sugerindo que essa via utilizou enzimas já existentes.

O metabolismo ácido das crassuláceas possibilita o crescimento em ecossistemas áridos

Muitas plantas crescendo em climas quentes e secos mantêm os estômatos de suas folhas fechados no calor do dia, impedindo a perda de água (Figura 20.17). Em consequência, o CO_2 não pode ser absorvido durante as horas de claridade, quando ele é necessário para a síntese de glicose. Em lugar disso, o CO_2 entra na folha quando os estômatos se abrem nas temperaturas mais frias da noite. Para armazenar o CO_2 até poder utilizá-lo durante o dia, essas plantas utilizam uma adaptação, o *metabolismo ácido das crassuláceas* (MAC), nome derivado do gênero *Crassulacea* (as plantas suculentas). O dióxido de carbono é fixado pela via C_4 em malato, que é armazenado em vacúolos. Durante o dia, o malato é descarboxilado, e o CO_2 torna-se disponível para o ciclo de Calvin.

Diferentemente das plantas C_4, as plantas de MAC separam o acúmulo de CO_2 da utilização de CO_2 no tempo, mais do que no espaço.

20.3 A via das pentoses fosfato gera NADPH e sintetiza açúcares de cinco carbonos

Os organismos fotossintéticos podem usar as reações de luz para a produção de algum NADPH. Outra via, que é encontrada em todos os organismos, preenche as necessidades de NADPH dos organismos e dos tecidos vegetais não fotossintéticos. A *via das pentoses fosfato* constitui uma fonte crucial de NADPH para uso na biossíntese redutora (Tabela 20.2), bem como para proteção contra o estresse oxidativo. Essa via é constituída de duas fases: (1) a geração oxidativa de NADPH e (2) a interconversão não oxidativa de açúcares (Figura 20.18). Na fase oxidativa, o NADPH é produzido quando a glicose 6-fosfato é oxidada a ribulose 5-fosfato, que é depois convertida em ribose 5-fosfato. A ribose 5-fosfato e seus derivados são componentes do RNA e do DNA, bem como do ATP, do NADH, do FAD e da coenzima A.

Tabela 20.2 Vias que necessitam de NADPH.

Síntese
Biossíntese de ácidos graxos
Biossíntese de colesterol
Biossíntese de neurotransmissores
Biossíntese de nucleotídios
Desintoxificação
Redução da glutationa oxidada
Mono-oxigenases do citocromo P450

$$\text{Glicose 6-fosfato} + 2\ NADP^+ + H_2O \rightarrow \text{ribulose 5-fosfato} + 2\ NADPH + 2\ H^+ + CO_2$$

Na fase não oxidativa, a via catalisa a interconversão de açúcares de três, quatro, cinco, seis e sete carbonos, em uma série de reações não oxidativas. O excesso de açúcares de cinco carbonos pode ser convertido em intermediários da via glicolítica. Todas essas reações ocorrem no citoplasma. Essas interconversões dependem das mesmas reações que levam à regeneração da ribulose 1,5-bifosfato no ciclo de Calvin.

Duas moléculas de NADPH são produzidas na conversão da glicose 6-fosfato em ribulose 5-fosfato

A fase oxidativa da via das pentoses fosfato começa com a desidrogenação da glicose 6-fosfato no carbono 1, em uma reação catalisada pela *glicose 6-fosfato desidrogenase* (Figura 20.19). Essa enzima é altamente específica para $NADP^+$; o K_M para o NAD^+ é cerca de mil vezes maior que a do $NADP^+$. O produto é a *6-fosfoglicono-δ-lactona,* um éster intramolecular entre o grupo carboxila C-1 e o grupo hidroxila C-5. A etapa seguinte consiste na hidrólise da 6-fosfoglicono-δ-lactona por uma *lactonase* específica, produzindo *6-fosfogliconato.* Esse açúcar de seis carbonos é então descarboxilado de modo oxidativo pela *6-fosfogliconato desidrogenase,* produzindo *ribulose-5-fosfato.* O $NADP^+$ é novamente o aceptor de elétrons.

A via das pentoses fosfato e a glicólise estão ligadas pela transcetolase e transaldolase

As reações precedentes produzem duas moléculas de NADPH e uma molécula de ribulose 5-fosfato para cada molécula de glicose 6-fosfato oxidada. A ribulose 5-fosfato é subsequentemente isomerizada em ribose 5-fosfato pela fosfopentose isomerase.

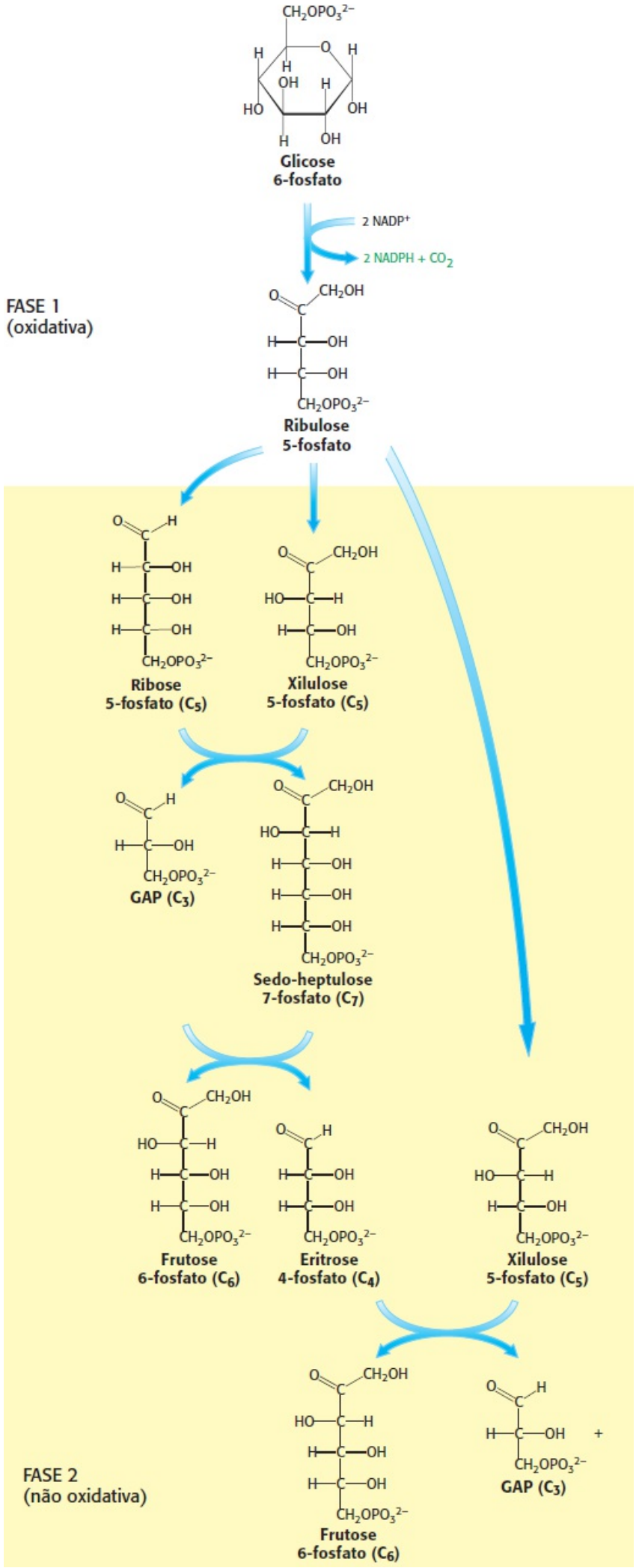
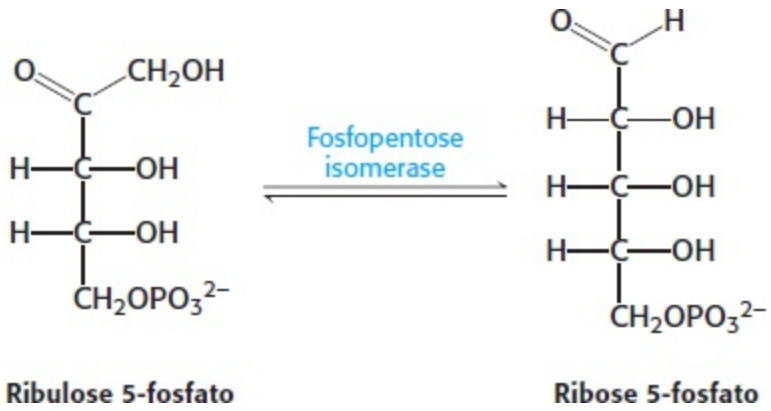

Glicose 6-fosfato
2 NADP+
2 NADPH + CO2
FASE 1 (oxidativa)
Ribulose 5-fosfato
Ribose 5-fosfato (C5)
Xilulose 5-fosfato (C5)
GAP (C3)
Sedo-heptulose 7-fosfato (C7)
Frutose 6-fosfato (C6)
Eritrose 4-fosfato (C4)
Xilulose 5-fosfato (C5)
Frutose 6-fosfato (C6)
GAP (C3)
FASE 2 (não oxidativa)

Figura 20.18 Via das pentoses fosfato. A via consiste em (1) uma fase oxidativa que produz NADPH e (2) uma fase não oxidativa que interconverte os açúcares fosforilados.



Embora a ribose 5-fosfato seja um precursor de numerosas biomoléculas, muitas células precisam bem mais de NADPH para biossínteses redutoras do que de ribose 5-fosfato para incorporação em nucleotídios e ácidos nucleicos. Por exemplo, o tecido adiposo, o fígado e as glândulas mamárias necessitam de grandes quantidades de NADPH para a síntese de ácidos graxos (Capítulo 22). Nesses casos, a ribose 5-fosfato é convertida nos intermediários glicolíticos, gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato, pela *transcetolase* e pela *transaldolase. Essas enzimas criam umaligação reversível entre a via das pentoses fosfato e a glicólise ao catalisar essas três reações sucessivas.*

$$C_5 + C_5 \xrightleftharpoons{\text{Transcetolase}} C_3 + C_7$$

$$C_3 + C_7 \xrightleftharpoons{\text{Transcetolase}} C_6 + C_4$$

$$C_4 + C_5 \xrightleftharpoons{\text{Transcetolase}} C_6 + C_3$$

O resultado final dessas reações consiste na *formação de duas hexoses e uma triose a partir de três pentoses:*

$$3\ C_5 \rightleftharpoons 2\ C_6 + C_3$$

A primeira das três reações que ligam a via das pentoses fosfato à glicólise é a formação de *gliceraldeído 3-fosfato* e *sedo-heptulose 7-fosfato* a partir de duas pentoses.

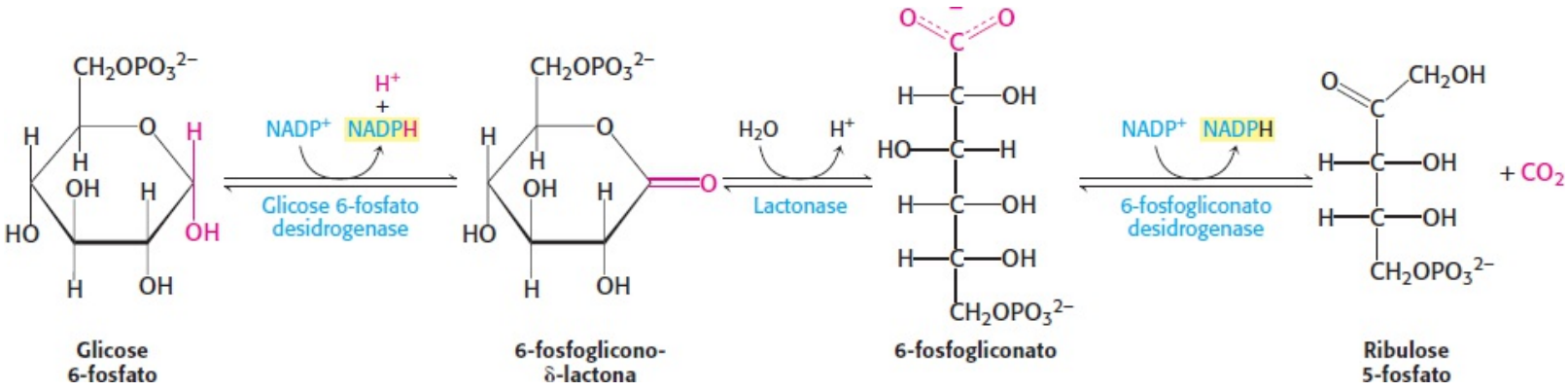
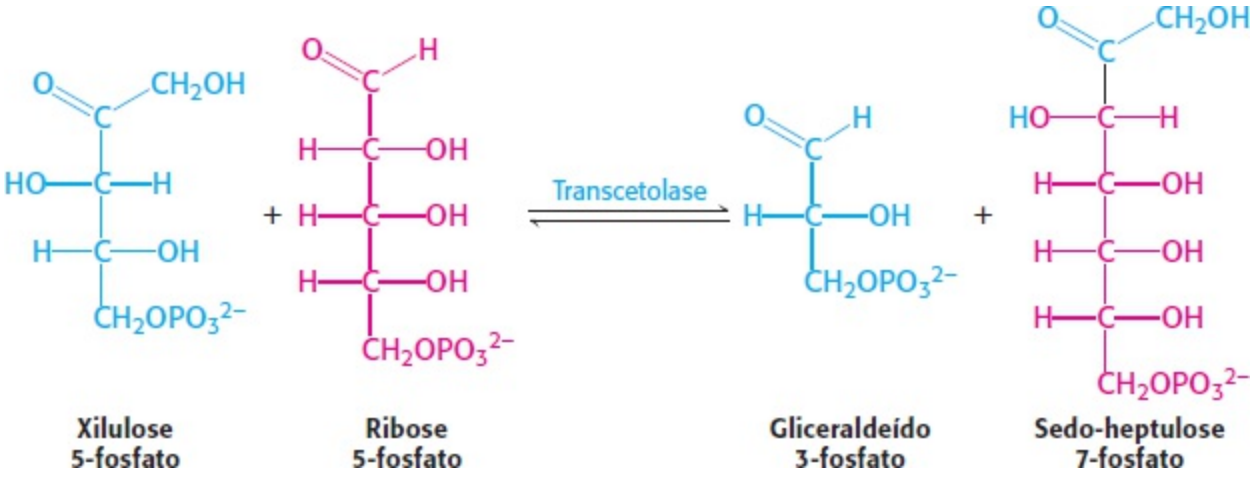
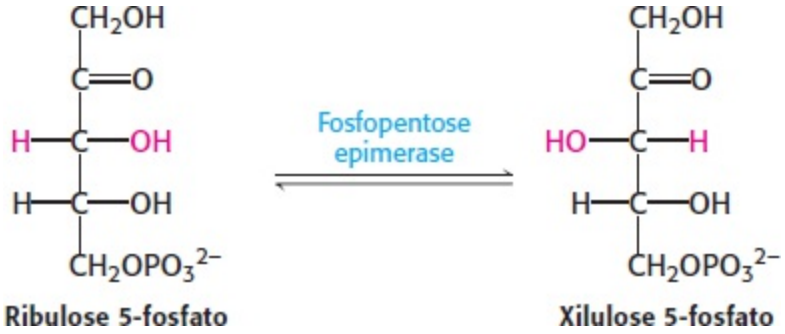


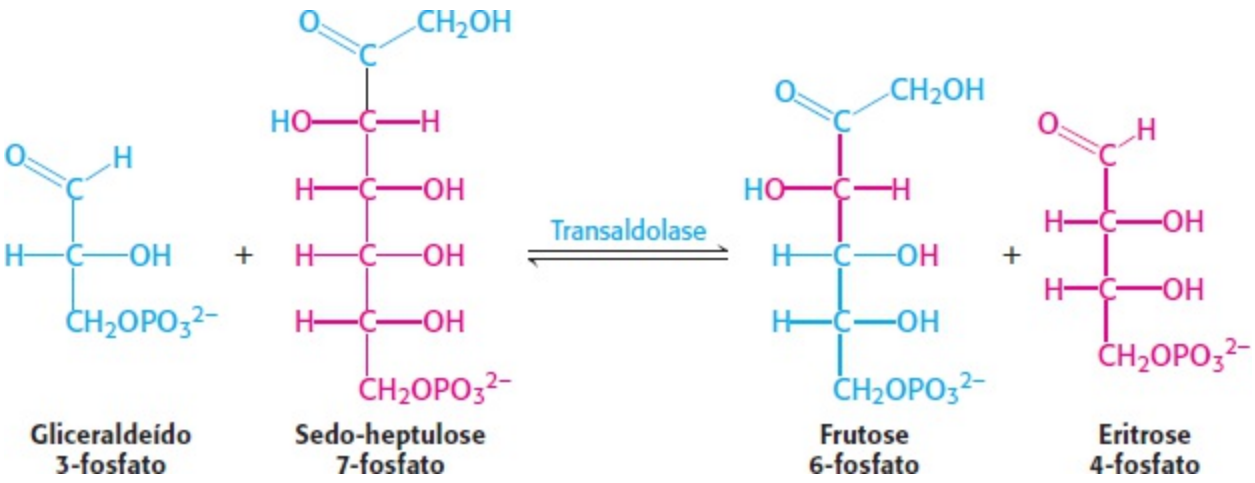
Figura 20.19 Fase oxidativa da via das pentoses fosfato. A glicose 6-fosfato é oxidada a 6-fosfoglicono-δ-lactona, com produção de uma molécula de NADPH. A lactona é hidrolisada a 6-fosfogliconato, que sofre descarboxilação oxidativa, originando ribulose 5-fosfato com a geração de uma segunda molécula de NADPH.



O doador da unidade de dois carbonos nessa reação é a xilulose 5-fosfato, um epímero da ribulose 5-fosfato. Uma cetose só é substrato da transcetolase se o seu grupo hidroxila em C-3 tiver a configuração da xilulose, e não da ribulose. A ribulose 5-fosfato é convertida no epímero apropriado para a reação da transcetolase pela *fosfopentose epimerase,* na reação reversa da que ocorre no ciclo de Calvin.

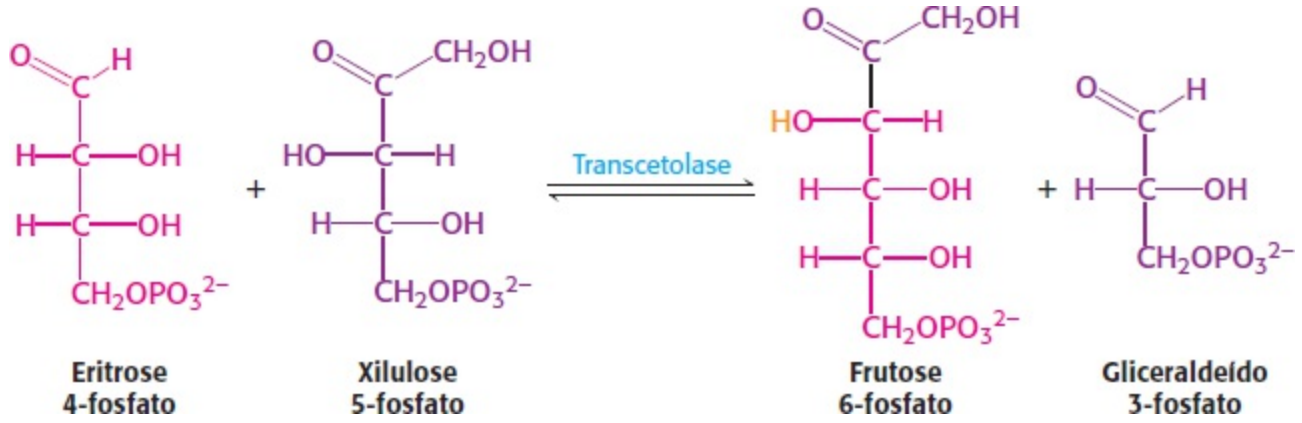


O gliceraldeído 3-fosfato e a sedoheptulose 7-fosfato gerados pela transcetolase reagem, então, para formar *frutose 6-fosfato* e *eritrose 4-fosfato.*



Essa síntese de um açúcar de quatro carbonos e de um açúcar de seis carbonos é catalisada pela *transaldolase.*

Na terceira reação, a transcetolase catalisa a síntese de *frutose 6-fosfato* e *gliceraldeído 3-fosfato* a partir da eritrose 4-fosfato e xilulose 5-fosfato.



A soma dessas reações é

2 Xilulose 5-fosfato + ribose 5-fosfato ⇌

2-frutose 6-fosfato + gliceraldeído 3-fosfato

A xilulose 5-fosfato pode ser formada a partir da ribose 5-fosfato pela ação sequencial da fosfopentose isomerase e fosfopentose epimerase, de modo que a reação final que começa a partir da ribose 5-fosfato é

3 Ribose 5-fosfato ⇌ 2 frutose 6-fosfato + gliceraldeído 3-fosfato

Por conseguinte, *o excesso de ribose 5-fosfato formado pela via das pentoses fosfato pode ser totalmente convertido em intermediários glicolíticos.* Além disso, qualquer ribose ingerida na alimentação pode ser processada a intermediários da glicólise por essa via. É evidente que os esqueletos de carbono dos açúcares podem sofrer extensos rearranjos para suprir as necessidades fisiológicas (Tabela 20.3).

Mecanismo | A transcetolase e a transaldolase estabilizam intermediários carbaniônicos por diferentes mecanismos.

As reações catalisadas pela transcetolase e pela transaldolase são distintas, porém semelhantes em muitos aspectos. Uma diferença é que a transcetolase transfere uma unidade de dois carbonos, enquanto a transaldolase transfere uma unidade de três carbonos. Cada uma dessas unidades fixa-se transitoriamente à enzima durante a reação.

Tabela 20.3 Via das pentoses fosfato.

Reação	Enzima
Fase oxidativa	
Glicose 6-fosfato + NADP+ → 6-fosfoglicono-δ-lactona + NADPH + H+	Glicose 6-fosfato desidrogenase
6-fosfoglicono-δ-lactona + H_2O → 6-fosfogliconato + H+	Lactonase
6-fosfogliconato + NADP+ → ribulose 5-fosfato + CO_2 + NADPH + H+	6-fosfogliconato desidrogenase

Fase não oxidativa	
Ribulose 5-fosfato ⇌ ribose 5-fosfato	Fosfopentose isomerase
Ribulose 5-fosfato ⇌ xilulose 5-fosfato	Fosfopentose epimerase
Xilulose 5-fosfato + ribose 5-fosfato ⇌ sedo-heptulose 7-fosfato + gliceraldeído 3-fosfato	Transcetolase
Sedo-heptulose 7-fosfato + gliceraldeído 3-fosfato ⇌ frutose 6-fosfato + eritrose 4-fosfato	Transaldolase
Xilulose 5-fosfato + eritrose 4-fosfato ⇌ frutose 6-fosfato + gliceraldeído 3-fosfato	Transcetolase

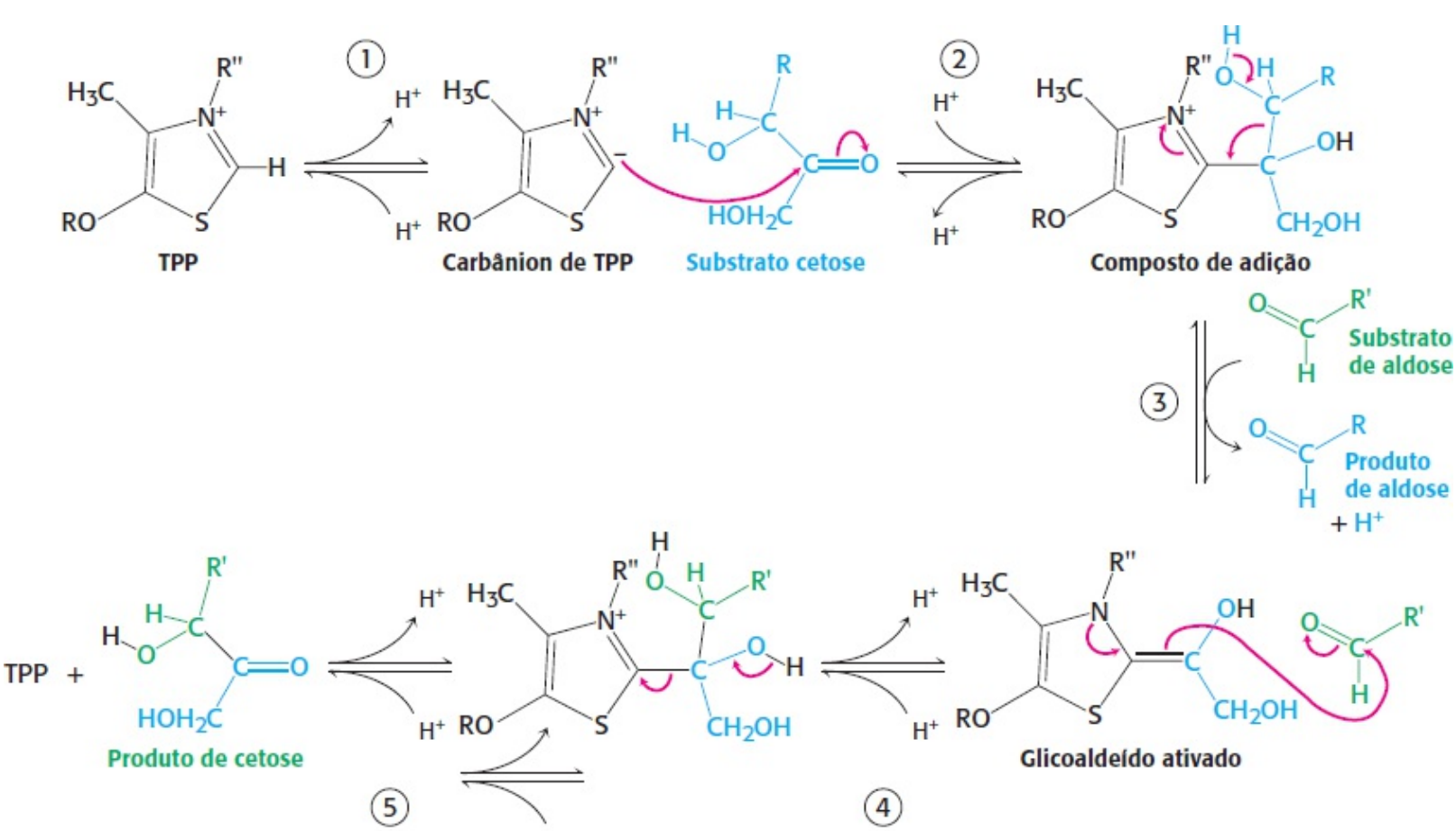


Figura 20.20 Mecanismo da transcetolase. **1.** A tiamina pirofosfato (TPP) sofre ionização para formar um carbânion. **2.** O carbânion da TPP ataca o substrato de cetose. **3.** A clivagem de uma ligação carbono-carbono libera o produto aldose e deixa um fragmento de dois carbonos ligado à TP. **4.** Esse intermediário glicoaldeído ativado ataca o substrato aldose, formando uma nova ligação carbono-carbono. **5.** O produto cetose é liberado, deixando a TPP pronta para o próximo ciclo de reações.

Reação da transcetolase. A transcetolase contém uma tiamina pirofosfato firmemente ligada como grupo prostético. A enzima transfere um glicoaldeído de dois carbonos de um doador de cetose para um aceptor de aldose. O local da adição da unidade de dois carbonos é o anel tiazólico da TP. A transcetolase é homóloga à subunidade E_1 do complexo da piruvato desidrogenase (Seção 17.1), e o mecanismo da reação é semelhante (Figura 20.20).

O átomo de carbono C-2 da TPP ligada ioniza-se prontamente, produzindo um *carbânion*. O átomo de carbono de carga negativa desse intermediário reativo ataca o grupo carbonila da cetose

substrato. O composto de adição resultante libera a aldose produto, dando origem a uma *unidade de glicoaldeído ativada.* O átomo de nitrogênio de carga positiva no anel tiazólico atua como *escoadouro de elétrons* no desenvolvimento desse intermediário ativado. O grupo carbonila de um aceptor de aldose apropriado condensa-se então com o glicoaldeído ativado, formando uma nova cetose, que é liberada da enzima.

Reação da transaldolase. A transaldolase transfere uma unidade de *di-hidroacetona* de três carbonos de um doador de cetose para um aceptor de aldose. Diferentemente da transcetolase, a transaldolase não contém um grupo prostético. Na verdade, *forma-se uma base de Schiff entre o grupo -amino de um resíduo de lisina no sítio ativo da enzima e o grupo carbonila do substrato cetose* (Figura 20.21). Esse tipo de intermediário enzima-substrato covalentemente ligado assemelha-se àquele formado na frutose 1,6-bifosfato com a aldolase na via glicolítica (Seção 16.1), e, com efeito, as enzimas são homólogas. A base de Schiff torna-se protonada, a ligação entre C-3 e C-4 é clivada, e uma aldose é liberada. A carga negativa na porção carbânion da base de Schiff é estabilizada por ressonância. O átomo de nitrogênio de carga positiva da base de Schiff protonada atua como escoadouro de elétrons. O aduto da base de Schiff é estável até se ligar a uma aldose apropriada. Em seguida, a porção di-hidroxiacetona reage com o grupo carbonila da aldose. A cetose, produto, é liberada por hidrólise da base de Schiff. O átomo de nitrogênio da base de Schiff protonada desempenha o mesmo papel na transaldolase que o átomo de nitrogênio do anel tiazólico na transcetolase. Em cada enzima, um grupo dentro de um intermediário reage como um carbânion, atacando um grupo carbonila para formar uma nova ligação carbono-carbono. Em cada caso, a carga no carbânion é estabilizada por ressonância (Figura 20.22).

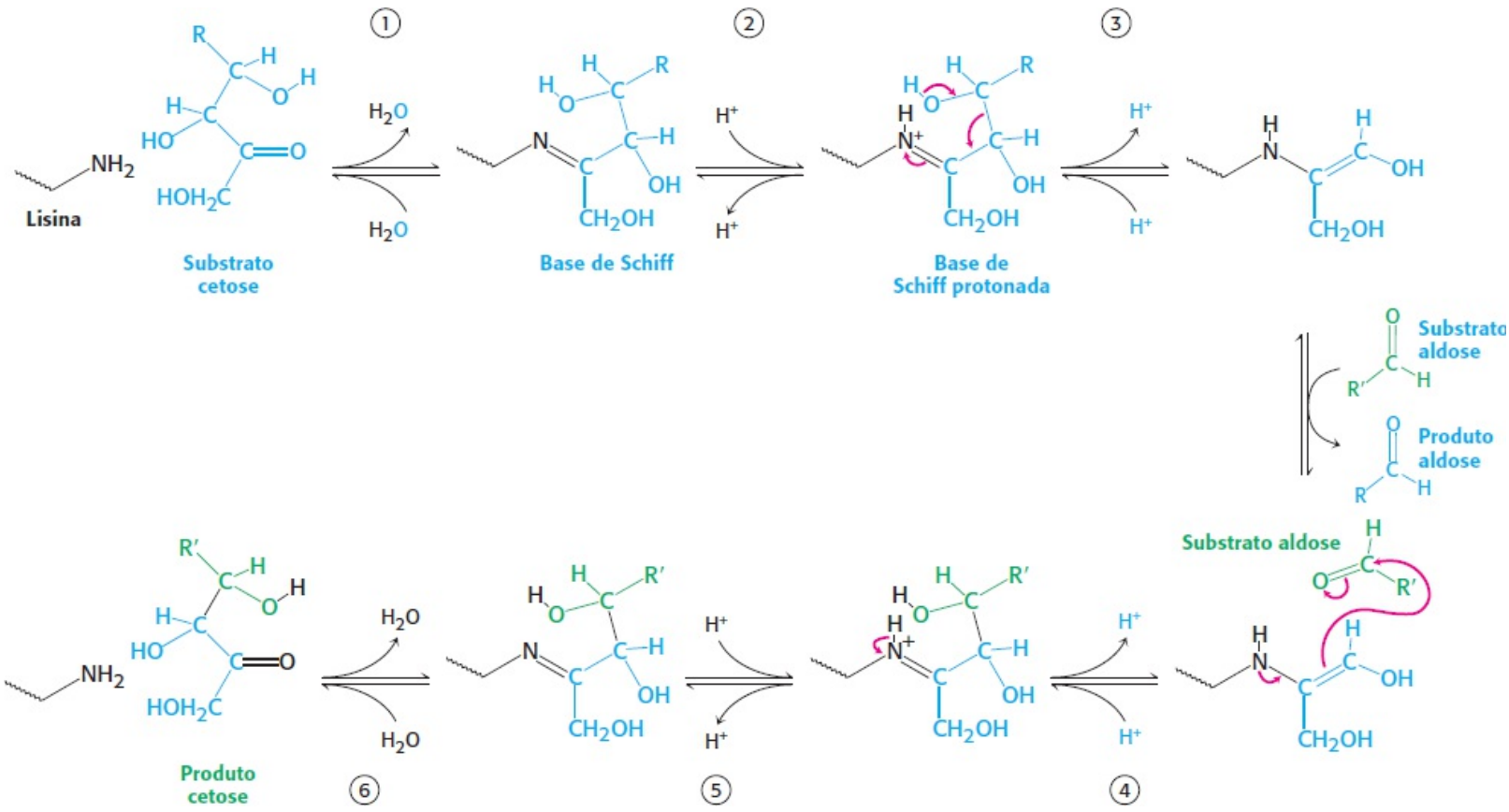


Figura 20.21 Mecanismo da transaldolase. 1. A reação começa com a formação de uma base de Schiff entre o substrato cetose e um resíduo de lisina da transaldolase. A protonação da base de Schiff (**2**) leva à liberação do produto aldose (**3**),

deixando um fragmento de três carbonos ligado ao resíduo de lisina. **4**. Esse intermediário é adicionado ao substrato aldose, sofrendo uma protonação concomitante para formar uma nova ligação carbono-carbono. A desprotonação subsequente (**5**) e a hidrólise da base de Schiff (**6**) liberam a cetose produto da cadeia lateral de lisina, completando o ciclo de reações.

20.4 O metabolismo da glicose 6-fosfato pela via das pentoses fosfato é coordenado com a glicólise

A glicose 6-fosfato é metabolizada pela via glicolítica (Capítulo 16) e pela via das pentoses fosfato. Como o processamento desse importante metabólito é dividido entre essas duas vias metabólicas? A concentração citoplasmática de $NADP^+$ desempenha um papel essencial na determinação do destino da glicose 6-fosfato.

A velocidade da via das pentoses fosfato é controlada pelo nível de $NADP^+$

A primeira reação no ramo oxidativo da via das pentoses fosfato, a desidrogenação da glicose 6-fosfato, é essencialmente irreversível. Com efeito, essa reação limita a velocidade em condições fisiológicas e atua como local de controle. O fator regulador mais importante é o nível de $NADP^+$. Baixos níveis de $NADP^+$ reduzem a desidrogenação da glicose 6-fosfato, visto que ele é necessário como aceptor de elétrons. O efeito dos baixos níveis de $NADP^+$ é intensificado pelo fato de que o NADPH compete com o $NADP^+$ pela ligação à enzima. A razão entre $NADP^+$ e NADPH no citoplasma de uma célula hepática de um rato bem alimentado é de cerca de 0,014, ou seja, várias ordens de magnitude abaixo da razão entre NAD^+ e NADH, que é de 700 nas mesmas condições. O acentuado efeito do nível de $NADP^+$ sobre a velocidade da fase oxidativa assegura que não haja produção de NADPH, a não ser que o suprimento necessário para as biossínteses redutoras seja baixo. A fase não oxidativa da via das pentoses fosfato é controlada principalmente pela disponibilidade de substratos.

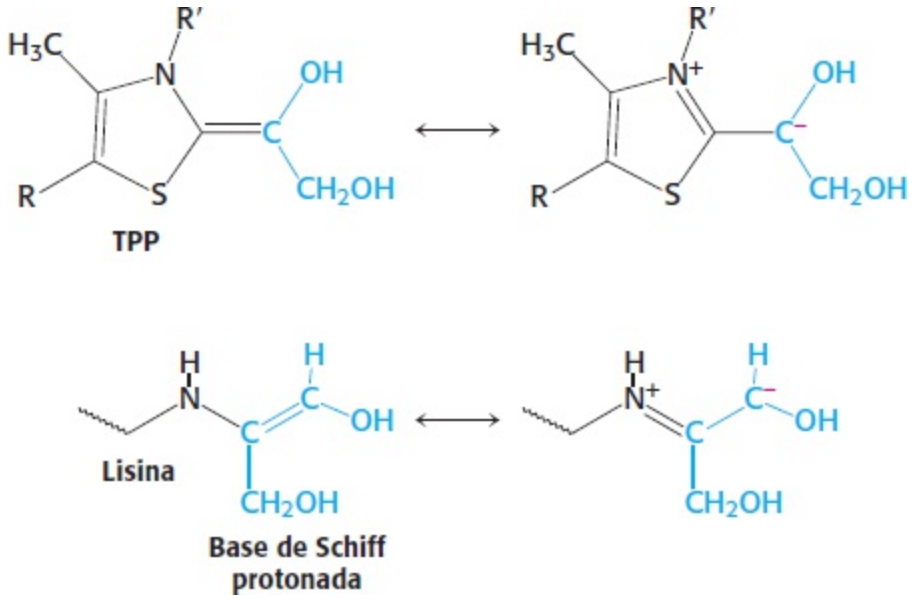


Figura 20.22 Intermediários de carbânion. Para a transcetolase e a transaldolase, um intermediário carbânion é estabilizado por ressonância. Na transcetolase, a TPP estabiliza esse intermediário; na transaldolase, uma base de Schiff protonada desempenha esse papel.

O fluxo da glicose 6-fosfato depende da necessidade de NADPH, de ribose 5-fosfato e de ATP

Podemos compreender a complexa interação entre a glicólise e a via das pentoses fosfato examinando o metabolismo da glicose 6-fosfato em quatro situações metabólicas diferentes (Figura 20.23).

Modo 1. *Há necessidade de muito mais ribose 5-fosfato do que de NADPH.* Por exemplo, as células que sofrem rápida divisão necessitam de ribose 5-fosfato para a síntese dos precursores nucleotídios do DNA. A maior parte da glicose 6-fosfato é convertida em frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato pela via glicolítica. Em seguida, a transaldolase e a transcetolase convertem duas moléculas de frutose 6-fosfato e uma molécula de gliceraldeído 3-fosfato em três moléculas de ribose 5-fosfato por uma reversão das reações descritas anteriormente. A estequiometria do modo 1 é

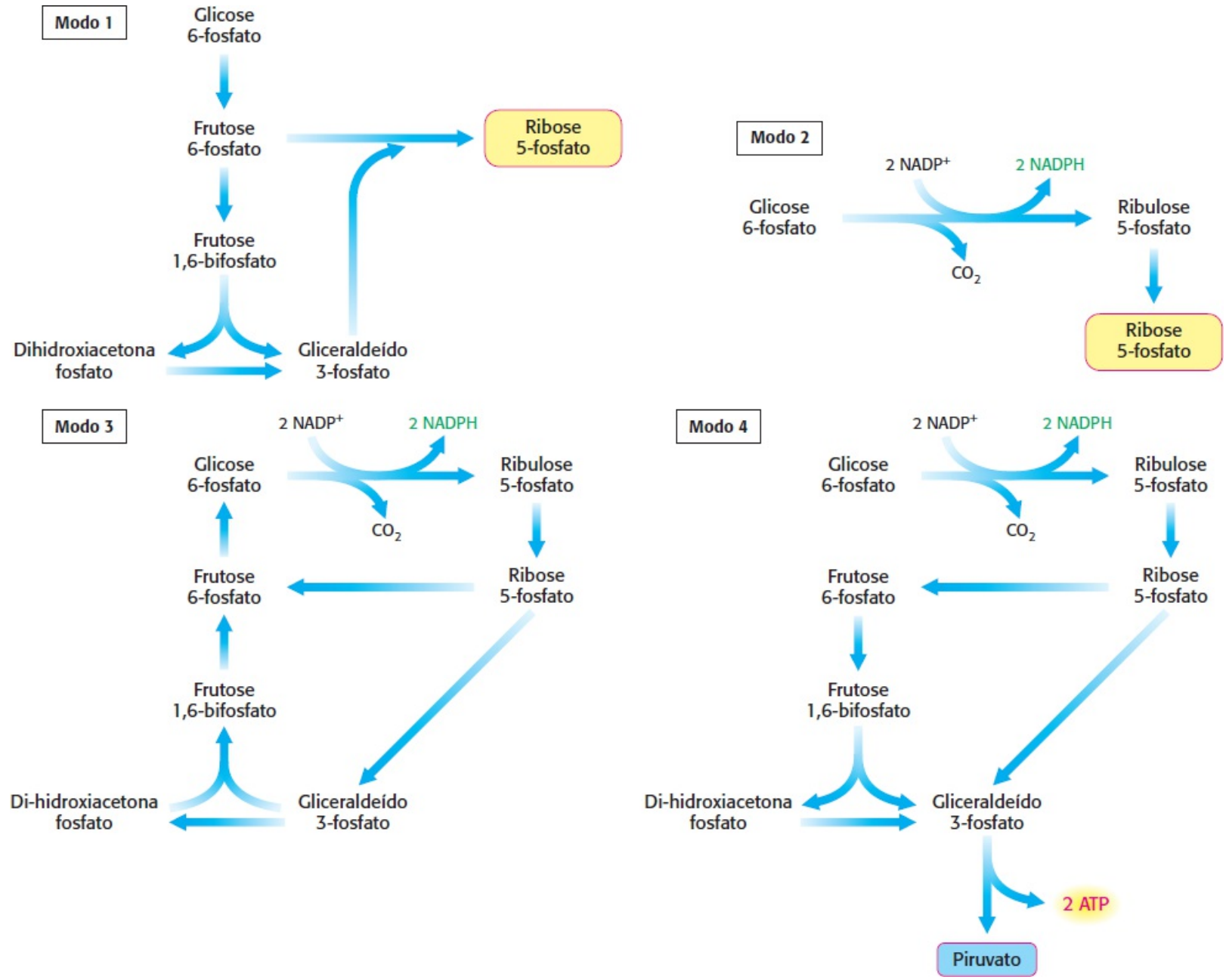


Figura 20.23 Quatro modos da via das pentoses fosfato. Os principais produtos são mostrados em cores.

Tabela 20.4 Tecidos com vias das pentoses fosfato ativas.

Tecido	Função
Glândula suprarrenal	Síntese de esteroides
Fígado	Síntese de ácidos graxos e colesterol
Testículo	Síntese de esteroides
Tecido adiposo	Síntese de ácidos graxos
Ovário	Síntese de esteroides
Glândula mamária	Síntese de ácidos graxos
Eritrócitos	Manutenção da glutationa reduzida

$$5 \text{ Glicose 6-fosfato} + \text{ATP} \rightarrow 6 \text{ ribose 5-fosfato} + \text{ADP} + 2\ H^+$$

Modo 2. *As necessidades de NADPH e de ribose 5-fosfato estão equilibradas.* A reação predominante nessas condições consiste na formação de duas moléculas de NADPH e uma molécula de ribose 5-fosfato a partir de uma molécula de glicose 6-fosfato na fase oxidativa da via das pentoses fosfato. A estequiometria do modo 2 é

$$\text{Glicose 6-fosfato} + 2\ NADP^+ + H_2O \rightarrow$$
$$\text{ribose 5-fosfato} + 2\ NADPH + 2\ H^+ + CO_2$$

Modo 3. *Há necessidade de muito mais NADPH do que de ribose 5-fosfato.* Por exemplo, o tecido adiposo necessita de um alto nível de NADPH para a síntese de ácidos graxos (Tabela 20.4). Neste caso, a glicose 6-fosfato é totalmente oxidada a CO_2. Três grupos de reações estão ativos nessa situação. Em primeiro lugar, a fase oxidativa da via das pentoses fosfato forma duas moléculas de NADPH e uma molécula de ribose 5-fosfato. Em seguida, a ribose 5-fosfato é convertida em frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato pela transcetolase e pela transaldolase. Por fim, a glicose 6-fosfato é novamente sintetizada a partir da frutose 6-fosfato e do gliceraldeído 3-fosfato pela via gliconeogênica. A estequiometria desses três conjuntos de reações é

$$6 \text{ Glicose 6-fosfato} + 12\ NADP^+ + 6\ H_2O \rightarrow$$
$$6 \text{ ribose 5-fosfato} + 12\ NADPH + 12\ H^+ + 6CO_2$$

$$6 \text{ Ribose 5-fosfato} \rightarrow 4 \text{ frutose 6-fosfato} + 2 \text{ gliceraldeído 3-fosfato}$$

$$4 \text{ Frutose 6-fosfato} + 2 \text{ gliceraldeído 3-fosfato} + H_2O - \rightarrow$$
$$5 \text{ glicose 6-fosfato} + P_i$$

A soma das reações do modo 3 é

$$\text{Glicose 6-fosfato} + 12\ NADP^+ + 7\ H_2O \rightarrow$$
$$6\ CO_2 + 12\ NADPH + 12\ H^+ + P_i$$

Por conseguinte, *o equivalente da glicose 6-fosfato pode ser totalmente oxidado a CO_2, com*

produção concomitante de NADPH. Em essência, a ribose 5-fosfato produzida pela via das pentoses fosfato é reciclada em glicose 6-fosfato pela transcetolase, pela transaldolase e por algumas das enzimas da via gliconeogênica.

Modo 4. *Tanto o NADPH quanto o ATP são necessários.* Como alternativa, a ribose 5-fosfato formada pela fase oxidativa da via das pentoses fosfato pode ser convertida em piruvato. A frutose 6-fosfato e o gliceraldeído 3-fosfato derivados da ribose 5-fosfato entram na via glicolítica, em lugar de reverter para a glicose 6-fosfato. Nesse modo, *ocorre produção concomitante de ATP e de NADPH, e cinco dos seis carbonos da glicose 6-fosfato emergem no piruvato.*

$$3\ \text{Glicose 6-fosfato} + 6\ NADP^+ + 5\ NAD^+ + 5\ P_i + 8\ ADP \rightarrow$$
$$5\ \text{piruvato} + 3\ CO_2 + 6\ NADPH + 5\ NADH$$
$$+ 8\ ATP + 2\ H_2O + 8\ H^+$$

O piruvato formado por essas reações pode ser oxidado para produzir mais ATP, ou pode ser utilizado como bloco de construção em uma variedade de biossínteses.

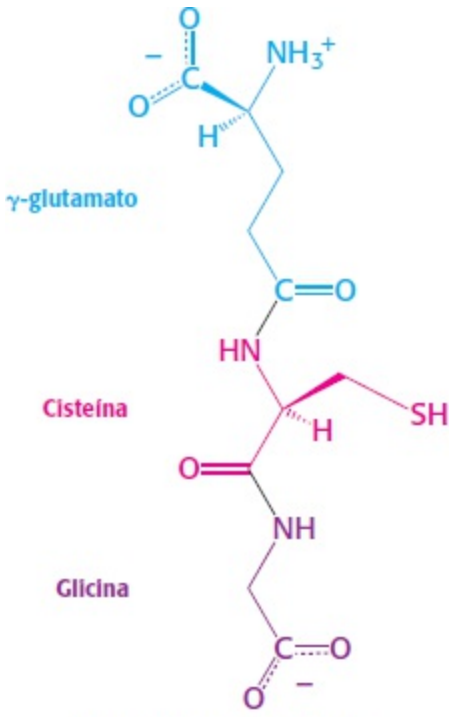
Através do espelho | O ciclo de Calvin e a via das pentoses fosfato são imagens especulares

Poderemos compreender melhor as complexidades do ciclo de Calvin e da via das pentoses fosfato se as considerarmos como imagens especulares funcionais uma da outra. O ciclo de Calvin começa com a fixação do CO_2 e prossegue, utilizando o NADPH na síntese de glicose. A via das pentoses fosfato começa com a oxidação de um átomo de carbono derivado da glicose a CO_2 e produz concomitantemente NADPH. A fase de regeneração do ciclo de Calvin converte moléculas de C_6 e C_3 de volta ao material inicial – a molécula C_5 de ribulose 1,5-bifosfato. A via das pentoses fosfato converte uma molécula C_5, a ribose 5-fosfato, em intermediários C_6 e C_3 da via glicolítica. Não é surpreendente que, nos organismos fotossintéticos, muitas enzimas sejam comuns às duas vias. Testemunhamos a economia da evolução: o uso de enzimas idênticas para reações semelhantes com diferentes finalidades.

20.5 A glicose 6-fosfato desidrogenase desempenha um papel essencial na proteção contra espécies reativas de oxigênio

O NADPH produzido na via das pentoses fosfato desempenha um papel vital ao proteger as células das espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*). As espécies reativas de oxigênio produzidas no metabolismo oxidativo causam dano a todas as classes de macromoléculas e, por fim, podem levar à morte celular; elas estão implicadas em diversas doenças humanas (ver Tabela 18.3). A *glutationa* reduzida (GSH), um tripeptídio com um grupo sulfidrila livre, combate o estresse oxidativo ao reduzir as ROS a formas inócuas. Uma vez cumprida a sua tarefa, a glutationa toma a forma oxidada (GSSG) e precisa ser reduzida para regenerar GSH. O poder redutor é fornecido pelo NADPH gerado pela glicose 6-fosfato desidrogenase na via das pentoses fosfato. Com efeito, as células com níveis reduzidos de glicose 6-fosfato desidrogenase são particularmente

sensíveis ao estresse oxidativo. Esse estresse é mais agudo nos eritrócitos que carecem de mitocôndrias e que não dispõem de meios alternativos para gerar um poder redutor.

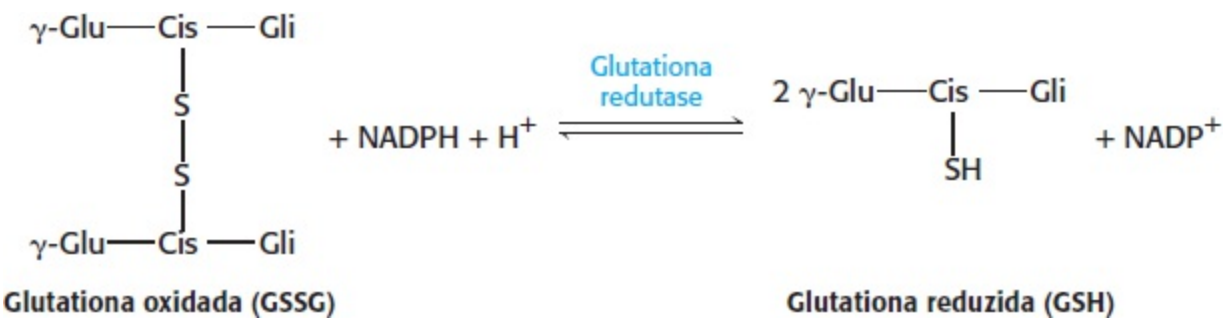


Glutationa (reduzida)
(γ-glutamilcisteinilglicina)

A deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase causa anemia hemolítica induzida por fármacos

A importância da via das pentoses fosfato é ressaltada pelas respostas anômalas que algumas pessoas apresentam a determinados fármacos. Por exemplo, a pamaquina, um medicamento antimalárico introduzido em 1926, foi associada ao aparecimento de doenças graves e misteriosas. A maioria dos pacientes tolerava bem o fármaco, porém alguns desenvolviam sintomas graves dentro de poucos dias após o início da terapia. A urina ficava escura, ocorria icterícia, e o nível de hemoglobina no sangue caía abruptamente. Em alguns casos, a destruição maciça dos eritrócitos levava à morte.

Trinta anos mais tarde, foi descoberto que essa *anemia hemolítica* induzida por fármacos era causada por uma *deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase,* a enzima que catalisa a primeira etapa da fase oxidativa da via das pentoses fosfato. O resultado consiste em uma escassez de NADPH em todas as células, porém essa deficiência é mais aguda nos eritrócitos. O defeito, que é herdado no cromossomo X, constitui a doença mais comum decorrente de uma disfunção enzimática, afetando centenas de milhões de pessoas. O principal papel do NADPH nos eritrócitos é reduzir a forma dissulfeto da glutationa na forma sulfidrila. A enzima que catalisa a regeneração da glutationa reduzida é a *glutationa redutase.*



Vicia faba. A planta *Vicia faba* do Mediterrâneo é uma fonte de favas que contêm o glicosídio purínico, a vicina. [Ingá Spence/Visuals Unlimited.]

Os eritrócitos com nível diminuído de glutationa reduzida são mais suscetíveis à hemólise.

A sensibilidade à pamaquina não é simplesmente uma singularidade histórica acerca do tratamento da malária há muitas décadas. A pamaquina é um glicosídio purínico da fava, um feijão que continua sendo consumido hoje em dia em países do Mediterrâneo. Os indivíduos com deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase sofrem hemólise com a ingestão de favas ou inalando o pólen das flores da planta, uma resposta denominada favismo. Como podemos explicar bioquimicamente a hemólise induzida pela pamaquina? A pamaquina é um agente oxidante que leva à produção de peróxidos, espécies reativas de oxigênio que podem causar lesão das membranas, bem como de outras biomoléculas. Os peróxidos são normalmente eliminados pela enzima *glutationa peroxidase,* que utiliza a glutationa reduzida como agente redutor.

$$2\,GSH + ROOH \xrightarrow{\text{Glutationa peroxidase}} GSSG + H_2O + ROH$$

Na ausência de glicose 6-fosfato desidrogenase, os peróxidos continuam lesionando as membranas, visto que não há produção de NADPH para restaurar a glutationa reduzida.

A glutationa reduzida também é essencial na manutenção da estrutura normal dos eritrócitos, pois

mantém a estrutura da hemoglobina. A forma reduzida da glutationa atua como tampão de sulfidrilas, mantendo os resíduos de hemoglobina na forma sulfidrila reduzida. Na ausência de níveis adequados de glutationa reduzida, os grupos sulfidrila da hemoglobina não podem ser mais mantidos na forma reduzida. Em seguida, as moléculas de hemoglobina estabelecem ligações cruzadas umas com as outras, formando agregados, denominados *corpúsculos de Heinz,* nas membranas celulares (Figura 20.24). As membranas lesionadas pelos corpúsculos de Heinz e pelas espécies reativas de oxigênio ficam deformadas, e a célula tende a sofrer lise. Por conseguinte, a resposta à nossa pergunta é que a glicose 6-fosfato desidrogenase é necessária para manter os níveis de glutationa reduzida para fornecer proteção contra o estresse oxidativo. Entretanto, na ausência de estresse oxidativo, a deficiência é bastante benigna. A sensibilidade dos indivíduos que apresentam essa deficiência de desidrogenase à pamaquina também demonstra claramente que as *reações atípicas a fármacos podem ter uma base genética.*

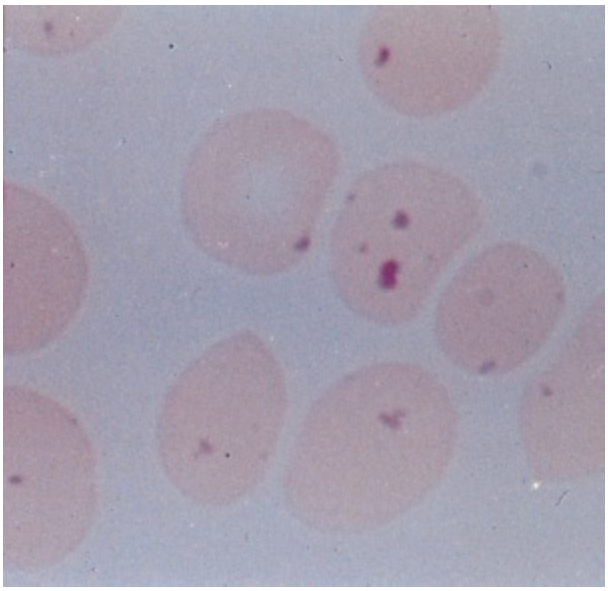


Figura 20.24 Eritrócitos com corpúsculos de Heinz. A micrografia de microscopia óptica mostra eritrócitos obtidos de um indivíduo com deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase. As partículas escuras, denominadas corpúsculos de Heinz, que estão dentro das células, consistem em agregados de hemoglobina desnaturada que aderem à membrana plasmática e coram-se com corantes básicos. Os eritrócitos desses indivíduos são altamente suscetíveis à lesão oxidativa. [Cortesia do Dr. Stanley Schrier.]

A deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase confere uma vantagem evolutiva em algumas circunstâncias

A incidência da forma mais comum de deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase, caracterizada por uma redução de 10 vezes na atividade da enzima nos eritrócitos, é de 11% entre norte-americanos de ascendência africana. Essa alta frequência sugere que a deficiência pode ser vantajosa em certas condições ambientais. Com efeito, *a deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase fornece uma proteção contra a malária causada pelo Plasmodium falciparum.* Os parasitos que causam essa doença necessitam de glutationa reduzida e dos produtos da via das pentoses fosfato para o seu crescimento ideal. Por conseguinte, a deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase constitui um mecanismo de proteção contra a malária, o que explica a sua alta frequência em regiões do mundo infestadas pela malária. Com esse exemplo, observamos mais uma vez a interação existente entre hereditariedade e ambiente na produção de doenças.

Resumo

20.1 O ciclo de Calvin sintetiza hexoses a partir do dióxido de carbono e da água

O ATP e o NADPH, que são formados nas reações de luz da fotossíntese, são utilizados para converter o CO_2 em hexoses e outros compostos orgânicos. A fase escura da fotossíntese, denominada ciclo de Calvin, começa com a reação do CO_2 com a ribulose 1,5-bifosfato para formar duas moléculas de 3-fosfoglicerato. As etapas na conversão do 3-fosfoglicerato em frutose 6-fosfato e glicose 6-fosfato são iguais àquelas da gliconeogênese, exceto que a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase dos cloroplastos é específica para o NAPDH, e não para o NADH. A ribulose 1,5-bifosfato é regenerada a partir da frutose 6-fosfato, do gliceraldeído 3-fosfato e da dihidroxiacetona fosfato por uma série complexa de reações. Várias das etapas na regeneração da ribulose 1,5-bifosfato são iguais às da via das pentoses fosfato. Três moléculas de ATP e duas moléculas de NADPH são consumidas para cada molécula de CO_2 convertida em hexose. O amido nos cloroplastos e a sacarose no citoplasma constituem as principais reservas de carboidratos nas plantas.

A rubisco também catalisa uma reação de oxigenase competitiva, que produz fosfoglicolato e 3-fosfoglicerato. A reciclagem do fosfoglicolato leva à liberação de CO_2 e consumo adicional de O_2, em um processo denominado fotorrespiração.

20.2 A atividade do ciclo de Calvin depende das condições ambientais

A tiorredoxina reduzida, formada pela transferência de elétrons da ferredoxina impulsionada pela luz, ativa as enzimas do ciclo de Calvin ao reduzir as pontes de dissulfeto. Os aumentos do pH e do nível de Mg^{2+} do estroma, induzidos pela luz, são importantes para estimular a carboxilação da ribulose 1,5-bifosfato pela rubisco. A fotorrespiração é minimizada nas plantas tropicais, que dispõem de uma via acessória – a via C_4 – para concentrar o CO_2 no local do ciclo de Calvin. Graças a essa via, as plantas tropicais tiram vantagem dos altos níveis de luz e minimizam a oxigenação da ribulose 1,5-bifosfato. As plantas nos ecossistemas áridos empregam o metabolismo ácido das crassuláceas para impedir a desidratação. Nas plantas de MAC, a via C_4 é ativa durante a noite, quando a planta troca gases com o ar. Durante o dia, a troca gasosa é eliminada, e ocorre produção de CO_2 a partir do malato armazenado em vacúolos.

20.3 A via das pentoses fosfato gera NADPH e sintetiza açúcares de cinco carbonos

Enquanto o ciclo de Calvin só ocorre nos organismos fotossintéticos, a via das pentoses fosfato é encontrada em todos os organismos. Ela produz NADPH e ribulose 5-fosfato no citoplasma, que é subsequentemente isomerizada a ribose 5-fosfato. O NADPH é utilizado em biossínteses redutoras, enquanto a ribose 5-fosfato é usada na síntese de RNA, DNA e coenzimas nucleotídicas. A via das pentoses fosfato começa com a desidrogenação da glicose 6-fosfato para formar uma lactona, que é hidrolisada, produzindo 6-fosfogliconato, e, em seguida, descarboxilada de modo oxidativo, produzindo ribulose 5-fosfato. O $NADP^+$ é o aceptor de elétrons em ambas as oxidações. A última etapa consiste em isomerização da ribulose 5-fosfato (uma cetose) a ribose 5-fosfato (uma aldose). Um modo diferente da via é ativo quando as células necessitam de quantidades muito maiores de NADPH do que de ribose 5-fosfato. Nessas

condições, a ribose 5-fosfato é convertida em gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato pela *transcetolase* e *transaldolase.* Essas duas enzimas estabelecem um elo reversível entre a via das pentoses fosfato e a gliconeogênese. A xilulose 5-fosfato, a sedo-heptulose 7-fosfato e a eritrose 4-fosfato são intermediários nessas interconversões. Dessa maneira, 12 moléculas de NADPH podem ser produzidas para cada molécula de glicose 6-fosfato totalmente oxidada a CO_2.

20.4 O metabolismo da glicose 6-fosfato pela via das pentoses fosfato é coordenado com a glicólise

Apenas o ramo não oxidativo da via está significativamente ativo quando é necessária a síntese de uma quantidade muito maior de ribose 5-fosfato do que de NADPH. Nessas condições, a frutose 6-fosfato e o gliceraldeído 3-fosfato (formados pela via glicolítica) são convertidos em ribose 5-fosfato, sem a formação de NADPH. De modo alternativo, a ribose 5-fosfato formada pelo ramo oxidativo pode ser transformada em piruvato por meio da frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato. Nesse modo, são gerados ATP e NADPH, e cinco dos seis carbonos da glicose 6-fosfato emergem no piruvato. A interação entre a via glicolítica e a via das pentoses fosfato possibilita um ajuste contínuo dos níveis de NADPH, ATP e dos blocos de construção, como a ribose 5-fosfato e o piruvato, para suprir as necessidades da célula.

20.5 A glicose 6-fosfato desidrogenase desempenha um papel essencial na proteção contra espécies reativas de oxigênio

O NADPH gerado pela glicose 6-fosfato desidrogenase mantém os níveis apropriados de glutationa reduzida, necessários para combater o estresse oxidativo e para manter o ambiente redutor apropriado na célula. As células com atividade diminuída da glicose 6-fosfato desidrogenase são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo.

Palavras-chave

aldolase (p. 599)
amido (p. 601)
autótrofo (p. 594)
ciclo de Calvin (reações de obscuridade) (p. 593)
fotorrespiração (p. 598)
glicose 6-fosfato desidrogenase (p. 605)
glutationa (p. 613)
heterótrofo (p. 594)
metabolismo ácido das crassuláceas (MAC) (p. 605)
peroxissomo (microcorpo) (p. 597)
planta C_3 (p. 604)
planta C_4 (p. 604)
reservatório de hexose
monofosfato (p. 598)
rubisco (ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase) (p. 595)
sacarose (p. 601)

tiorredoxina (p. 603)
transcetolase (p. 598)
via C_4 (p. 604)
via de pentose fosfato (p. 605)

Questões

1. *Um ciclo vital.* Por que o ciclo de Calvin é crucial no funcionamento de todas as formas de vida?

2. *Comparar e contrastar.* Identifique as semelhanças e as diferenças entre o ciclo de Krabs e o ciclo de Calvin.

3. *Experimentos de marcação.* Quando Melvin Calvin realizou seus experimentos iniciais de fixação do carbono, expôs algas ao dióxido de carbono radioativo. Depois de 5 segundos, apenas um único composto orgânico continha radioatividade, e, depois de 60 segundos, muitos compostos haviam incorporado a radioatividade. (a) Que composto inicialmente continha radioatividade? (b) Quais são os compostos que apresentaram radioatividade depois de 60 segundos?

4. *Harmonia em três partes.* Pode-se considerar o ciclo de Calvin como um processo que ocorre em três partes ou estágios. Descreva esses estágios.

5. *Nem sempre a mais rápida.* Forneça uma razão pela qual a rubisco poderia ser a enzima mais abundante do mundo.

6. *Uma necessidade.* Em uma atmosfera desprovida de CO_2, porém rica em O_2, a atividade de oxigenase da rubisco desaparece. Por quê?

7. *Redução local.* A gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase nos cloroplastos utiliza NADPH para participar na síntese de glicose. Na gliconeogênese que ocorre no citoplasma, a isozima da desidrogenase usa NADH. Qual a vantagem da enzima dos cloroplastos utilizar NADPH?

8. *Eclipse total.* Uma suspensão iluminada de *Chlorella* está realizando ativamente a fotossíntese. Suponha que a luz tenha sido subitamente desligada. Como os níveis de 3-fosfoglicerato e ribulose 1,5-bifosfato se modificariam no minuto seguinte?

9. *Privação de CO_2.* Uma suspensão iluminada de *Chlorella* está realizando ativamente a fotossíntese na presença de 1% de CO_2. A concentração de CO_2 é reduzida abruptamente para 0,003%. Que efeito essa redução teria sobre os níveis de 3-fosfoglicerato e ribulose 1,5-bifosfato durante o minuto seguinte?

10. *Operação de salvamento.* Escreva uma equação equilibrada para transaminação do glioxilato na produção de glicina.

11. *Dias de canícula de agosto.* Antes da época dos gramados bem cuidados, a maioria dos proprietários praticava darwinismo em horticultura. O resultado era que o exuberante gramado do início de verão frequentemente se transformava em culturas robustas de capim-colchão nos dias de canícula de agosto. Forneça uma explicação bioquímica possível para essa transição.

12. *Está calor aqui, ou sou eu?* Por que a via C_4 é valiosa para as plantas tropicais?

13. *Nada é de graça.* Explique por que a manutenção de uma alta concentração de CO_2 nas células da bainha do feixe das plantas C_4 representa um exemplo de transporte ativo. Qual a quantidade de ATP necessária por CO_2 para manter uma alta concentração de CO_2 nas células da bainha do feixe das plantas C_4?

14. *Respirando fotos?* O que é fotorrespiração, qual a sua causa e por que se acredita que seja um desperdício?

15. *Aquecimento global.* As plantas C_3 são mais comuns em latitudes altas e tornam-se menos comuns em latitudes próximas ao Equador. O inverso é verdadeiro para as plantas C_4. Como o aquecimento global poderia afetar essa distribuição?

16. *Comunicação.* Quais as alterações dependentes de luz no estroma que regulam o ciclo de Calvin?

17. *Elo.* Descreva como a via das pentoses fosfato e a glicólise estão ligadas entre si pela transaldolase e transcetolase.

18. *Rastreando a glicose.* A glicose marcada com ^{14}C em C-6 é acrescentada a uma solução contendo as enzimas e cofatores da fase oxidativa da via das pentoses fosfato. Qual o destino do marcador radioativo?

19. *Descarboxilações recorrentes.* Qual é a reação do ciclo do ácido cítrico mais análoga à descarboxilação oxidativa do 6-fosfogliconato a ribulose 5-fosfato? Que tipo de intermediário ligado à enzima é formado em ambas as reações?

20. *Estequiometria de síntese.* Qual é a estequiometria da síntese de (a) ribose 5-fosfato a partir de glicose 6-fosfato sem a produção concomitante de NADPH? (b) NADPH a partir da glicose 6-fosfato sem a formação concomitante de pentoses?

21. *Miúdo ou colossal?* O fígado e outras vísceras contêm grandes quantidades de ácidos nucleicos. Durante o processo de digestão, o RNA é hidrolisado a ribose, entre outras substâncias químicas. Explique como a ribose pode ser usada como combustível.

22. *Um ATP necessário.* O metabolismo da glicose 6-fosfato em ribose 5-fosfato pelo esforço combinado da via das pentoses fosfato e da glicólise pode ser resumido pela seguinte equação.

5 glicose + 6-fosfato + ATP →

6 ribose 5-fosfato + ADP

Que reação necessita de ATP?

23. *Nenhuma respiração.* Em condições normais, a glicose é totalmente oxidada a CO_2 nas mitocôndrias. Em que circunstância a glicose pode ser totalmente oxidada a CO_2 no citoplasma?

24. *Tome cuidado com a sua dieta, doutor.* O renomado psiquiatra Hannibal Lecter uma vez confessou a Clarice Starling, agente do FBI, que gostava de fígado com favas e um bom vinho Chianti. Por que essa dieta pode ser perigosa para algumas pessoas?

25. *Nenhuma redundância.* Por que a deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase manifesta-se frequentemente como anemia?

26. *Controle de lesão.* Qual o papel da glutationa na proteção contra lesão por espécies reativas de

oxigênio? Por que a via das pentoses fosfato é crucial para essa proteção?

27. *Poder redutor.* Qual é a razão entre NADPH e $NADP^+$ necessária para manter [GSH] = 10 mM e [GSSG] = 1 mM? Utilize os potenciais redox fornecidos na Tabela 18.1.

Questões sobre mecanismo

28. *Uma abordagem alternativa.* Os mecanismos de algumas aldoses não incluem intermediários de base de Schiff. Na verdade, essas enzimas necessitam de íons metálicos ligados. Proponha um mecanismo desse tipo para a conversão da di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato em frutose 1,6-bifosfato.

29. *Um intermediário recorrente.* A fosfopentose isomerase efetua a interconversão da aldose, ribose 5-fosfato, e da cetose, ribulose 5-fosfato. Proponha um mecanismo.

Questões | Integração de capítulos

30. *Capturando carbonos.* Experimentos com marcadores radioativos podem fornecer estimativas sobre a quantidade de glicose 6-fosfato metabolizada pela via das pentoses fosfato e a quantidade metabolizada pela ação combinada da glicólise e do ciclo do ácido cítrico. Suponha que você tenha amostras de dois tecidos diferentes, bem como duas amostras de glicose marcadas radioativamente, uma marcada com ^{14}C em C-1 e a outra marcada com ^{14}C em C-6. Projete um experimento que lhe possibilite determinar a atividade relativa do metabolismo aeróbico da glicose em comparação com o metabolismo pela via das pentoses fosfato.

31. *Eficiência da fotossíntese.* Utilize as seguintes informações para estimar a eficiência da fotossíntese.

Para a redução do CO_2 ao nível da hexose, $\Delta G^{o'}$ é de +477 kJ mol^{-1} (+114 kcal mol^{-1}).

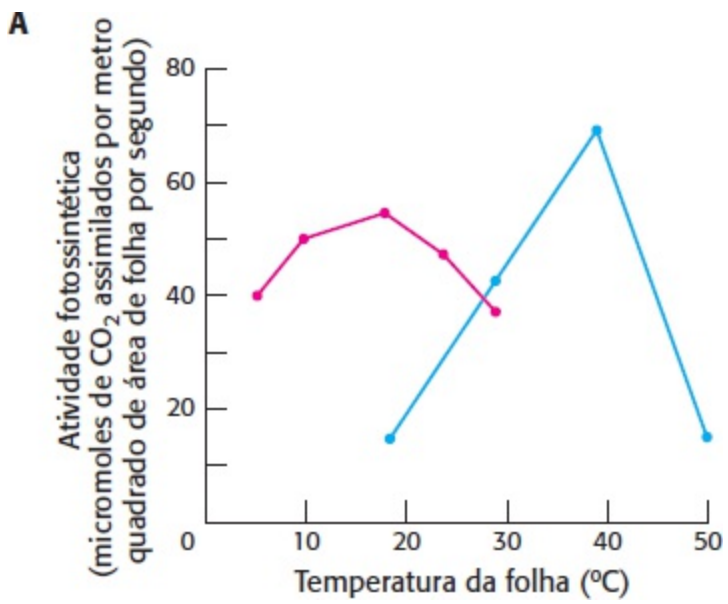
Um mol de fótons de 600 nm tem um conteúdo energético de 199 kJ (47,6 kcal).

Suponha que o gradiente de prótons gerado na produção do NADPH necessário seja suficiente para impulsionar a síntese do ATP necessário.

32. *Uma violação da Primeira Lei?* A combustão completa da glicose a CO_2 e H_2O produz 30 ATP, como mostra a Tabela 18.4. Entretanto, a síntese de glicose necessita de apenas 18 ATP. Como é possível que a síntese de glicose a partir de CO_2 e H_2O necessite apenas de 18 ATP, enquanto a combustão do CO_2 e da H_2O produz 30 ATP? Será uma violação da Primeira Lei da termodinâmica, ou talvez um milagre?

Questão | Interpretação de dados

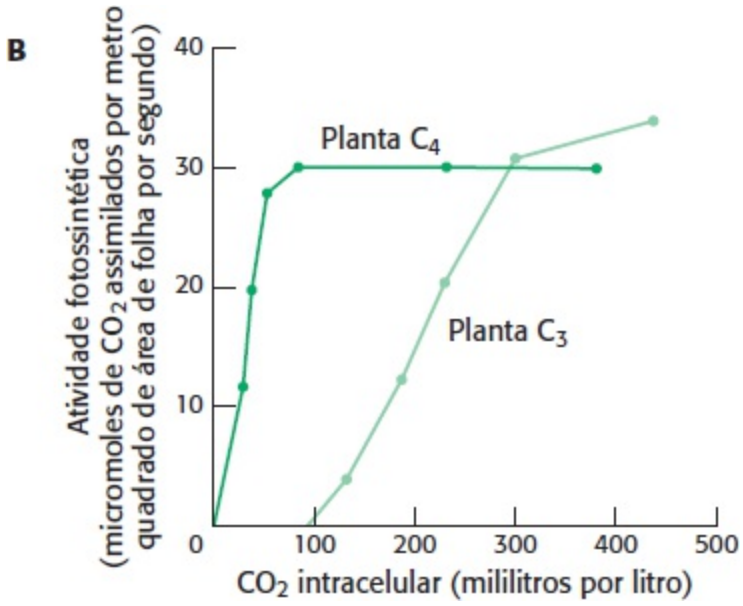
33. *Decidindo entre 3 e 4.* O gráfico A mostra a atividade de fotossíntese de duas espécies de plantas, uma planta C_4 e outra C_3, em função da temperatura da folha.



(a) Quais dados foram mais provavelmente gerados pela planta C_4 e quais pela planta C_3? Explique.

(b) Forneça algumas explicações possíveis para o fato de a atividade de fotossíntese cair em temperaturas mais altas.

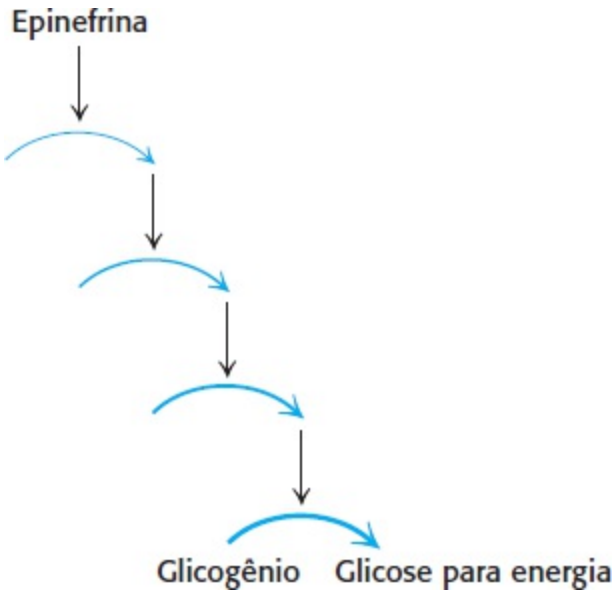
O gráfico B ilustra como a atividade de fotossíntese das plantas C_3 e C_4 varia com a concentração de CO_2, quando a temperatura (30°C) e a intensidade luminosa (alta) são constantes.



(c) Por que as plantas C_4 desenvolvem-se em concentrações de CO_2 que não sustentam o crescimento das plantas C_3?

(d) Forneça uma explicação plausível para o fato de as plantas C_3 continuarem aumentando a atividade de fotossíntese em concentrações mais altas de CO_2, enquanto as plantas C_4 alcançam um platô.

Metabolismo do Glicogênio



Cascatas de sinalização levam à mobilização do glicogênio para produzir glicose, uma fonte de energia para corredores. [À esquerda, Steve Krull/Alamy.]

SUMÁRIO

21.1 Adegradação do glicogênio requer a interação de várias enzimas
21.2 Afosforilase é regulada por interações alostéricas e por fosforilação reversível
21.3 Aepinefrina e o glucagon sinalizam a necessidade de degradação do glicogênio
21.4 O glicogênio é sintetizado e degradado por vias diferentes
21.5 Adegradação e a síntese de glicogênio são reguladas de modo recíproco

A glicose é um combustível importante e, como veremos adiante, um precursor essencial na biossíntese de numerosas moléculas. Entretanto, a glicose não pode ser armazenada, visto que a sua presença em altas concentrações perturba o equilíbrio osmótico da célula, o que causaria lesão ou morte celular. Como é possível manter reservas adequadas de glicose sem lesionar a célula? A solução para esse problema consiste no armazenamento da glicose na forma de um polímero não osmoticamente ativo, denominado glicogênio.

O glicogênio é uma *forma de armazenamento prontamente mobilizada de glicose*. Trata-se de um polímero ramificado muito grande de resíduos de glicose, que pode ser decomposto para produzir moléculas de glicose quando há necessidade de energia (Figura 21.1). Uma molécula de glicogênio tem aproximadamente 12 camadas de moléculas de glicose e pode alcançar até 40 nm. Os resíduos de glicose no glicogênio estão ligados, em sua maioria, por ligações glicosídicas α-1,4 (Figura 21.2). As ramificações a cada 10 resíduos, aproximadamente, são criadas por ligações glicosídicas α-1,6. Convém lembrar que as ligações α-glicosídicas formam polímeros helicoidais abertos, enquanto as ligações β produzem filamentos quase lineares que formam fibrilas estruturais, como na celulose (ver Figura 11.14).

O glicogênio não é tão reduzido quanto os ácidos graxos e, em consequência, não é tão rico em energia. Por que todo o excesso de energia não é armazenado na forma de ácidos graxos, em lugar de glicogênio? A liberação controlada de glicose a partir do glicogênio mantém os níveis de glicemia entre as refeições. O sangue circulante abastece o cérebro com glicose, que praticamente constitui o único combustível usado pelo cérebro, exceto durante o jejum prolongado. Além disso, a glicose prontamente mobilizada do glicogênio representa uma boa fonte de energia para o desempenho de uma atividade súbita e vigorosa. Diferentemente dos ácidos graxos, a glicose liberada pode fornecer energia na ausência de oxigênio e, portanto, pode constituir um suprimento de energia para a atividade anaeróbica.

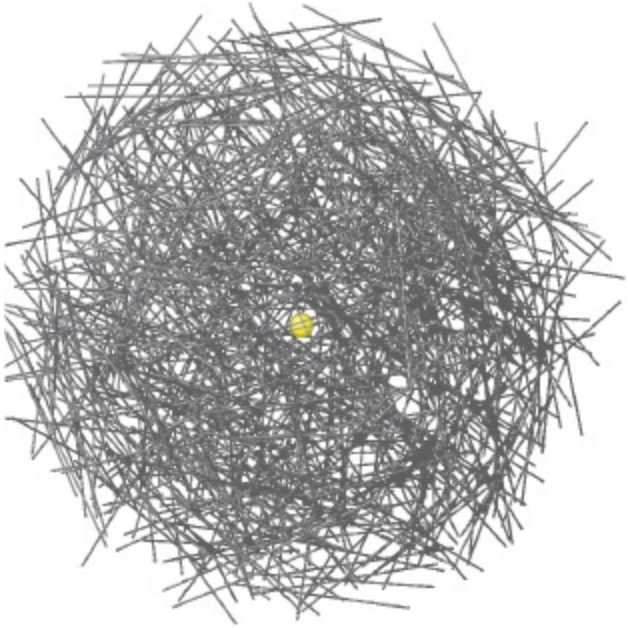


Figura 21.1 Glicogênio. No cerne da molécula de glicogênio encontra-se a proteína glicogenina (p. 632). As extremidades não redutoras da molécula de glicogênio formam a superfície do grânulo de glicogênio. A degradação ocorre nessa superfície. [De R. Melendez *et al. Biophys. J.* 77:1327-1332, 1999.]

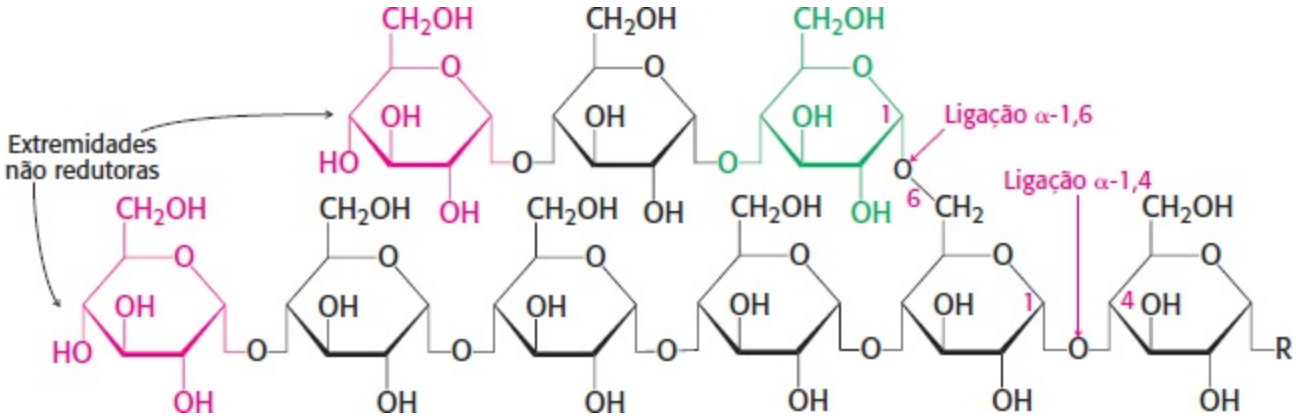


Figura 21.2 Estrutura do glicogênio. Nessa estrutura de duas ramificações externas de uma molécula de glicogênio, os resíduos nas extremidades não redutoras são mostrados em vermelho, e o resíduo que dá início a uma ramificação é mostrado em verde. O restante da molécula de glicogênio é representado por R.

Embora a maioria dos tecidos tenha uma certa quantidade de glicogênio, os dois locais principais de armazenamento de glicogênio são o fígado e o músculo esquelético. A concentração de glicogênio é maior no fígado do que no músculo (10% *versus* 2% por peso), porém existe maior quantidade de glicogênio armazenado no músculo esquelético, em virtude da massa muito maior do músculo. O glicogênio é encontrado no citoplasma, e a sua molécula aparece na forma de grânulos (Figura 21.3). No fígado, a síntese e a degradação do glicogênio são reguladas para manter os níveis de glicemia necessários para suprir as necessidades do organismo como um todo. Por outro lado, no músculo, esses processos são regulados para atender às necessidades energéticas do próprio músculo.

Figura 21.3 Micrografia eletrônica de uma célula hepática. As partículas densas no citoplasma são grânulos de glicogênio. [Cortesia do Dr. George Palade.]

O metabolismo do glicogênio consiste na liberação e armazenamento regulados da glicose

A degradação e a síntese do glicogênio são processos bioquímicos simples. A degradação do glicogênio consiste em três etapas: (1) a liberação de glicose 1-fosfato do glicogênio, (2) o remodelamento do substrato, o glicogênio, para possibilitar a degradação subsequente, e (3) a conversão da glicose 1-fosfato em glicose 6-fosfato para metabolismo posterior. A glicose 6-fosfato derivada da degradação do glicogênio tem três destinos possíveis (Figura 21.4): (1) constitui o substrato inicial para a glicólise, (2) pode ser convertida em glicose livre para a liberação na corrente sanguínea, e (3) pode ser processada pela via das pentoses fosfato, produzindo NADPH e derivados de ribose. A conversão do glicogênio em glicose livre ocorre principalmente no fígado.

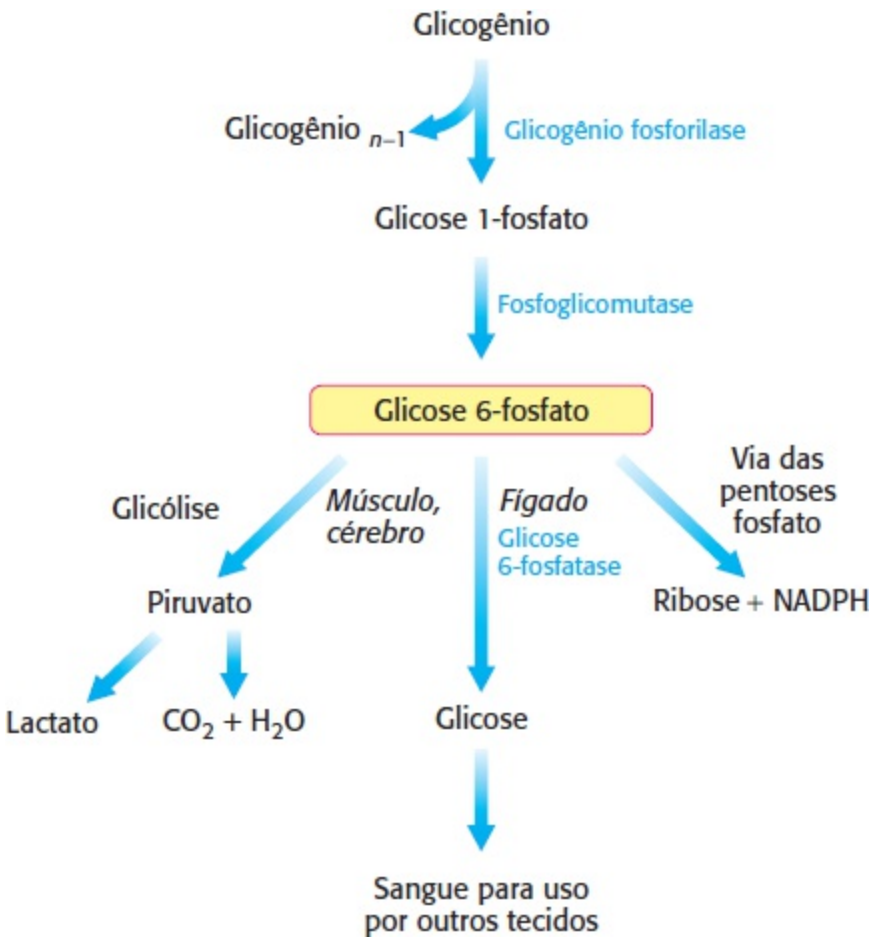


Figura 21.4 Destinos da glicose 6-fosfato. A glicose 6-fosfato derivada do glicogênio pode (**1**) ser utilizada como fonte de energia para o metabolismo anaeróbico ou aeróbico, como, por exemplo, no músculo; (**2**) ser transformada em glicose livre no fígado e subsequentemente liberada no sangue; (**3**) ser processada pela via das pentoses fosfato, gerando NADPH ou

ribose em uma variedade de tecidos.

A síntese de glicogênio, que ocorre quando a glicose está presente em quantidades abundantes, exige uma forma ativada de glicose, a uridina difosfato glicose (UDP-glicose), formada pela reação de UTP com glicose 1-fosfato. Como no caso da degradação do glicogênio, a molécula de glicogênio precisa ser remodelada para continuar a síntese.

A regulação da degradação e da síntese de glicogênio é complexa. Várias enzimas que fazem parte do metabolismo do glicogênio respondem de modo alostérico a metabólitos que sinalizam as necessidades energéticas da célula. *Por meio dessas respostas alostéricas, a atividade enzimática é ajustada para atender às necessidades da célula.* Além disso, hormônios podem desencadear cascatas de sinalização que levam à fosforilação reversível de enzimas, alterando suas velocidades catalíticas. *A regulação por hormônios ajusta o metabolismo do glicogênio para atender às necessidades do organismo como um todo.*

21.1 A degradação do glicogênio requer a interação de várias enzimas

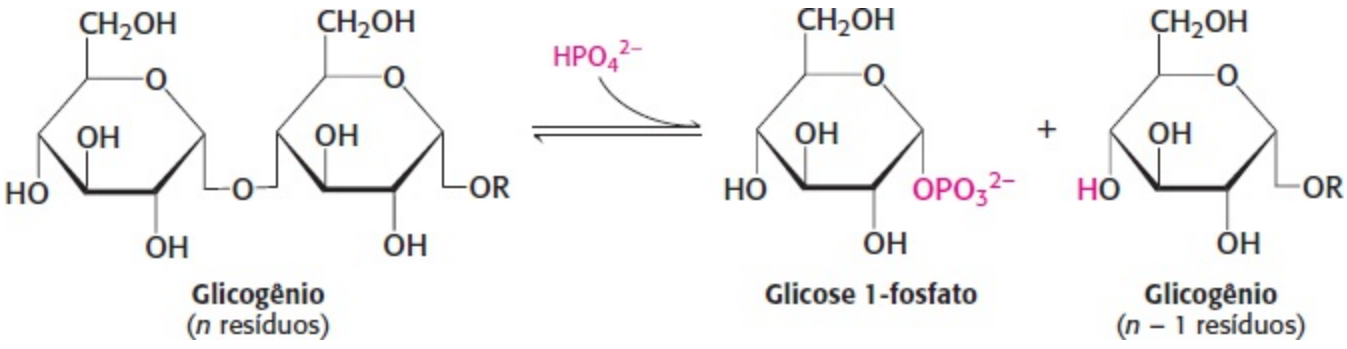
A degradação eficiente do glicogênio para fornecer glicose 6-fosfato para metabolismo posterior requer quatro atividades enzimáticas: uma para degradar o glicogênio, duas para remodelá-lo de modo que possa ser um substrato para degradação, e uma para converter o produto de degradação do glicogênio em uma forma apropriada para metabolismo posterior. Examinaremos cada uma dessas atividades separadamente.

A fosforilase catalisa a clivagem fosforolítica do glicogênio, liberando glicose 1-fosfato

A *glicogênio fosforilase*, a enzima-chave na degradação do glicogênio, cliva o seu substrato pela adição de ortofosfato (P_i), produzindo *glicose 1-fosfato*. A clivagem de uma ligação pelo acréscimo de ortofosfato é denominada *fosforólise*.

$$\underset{(n\ \text{resíduos})}{\text{Glicogênio} + \text{Pi}} \rightleftharpoons \underset{(n-1\ \text{resíduos})}{\text{glicose 1-fosfato} + \text{glicogênio}}$$

A fosforilase catalisa a remoção sequencial de resíduos glicosil das extremidades não redutoras da molécula de glicogênio (as extremidades com um grupo OH livre no carbono 4). O ortofosfato cliva a ligação glicosídica entre o C-1 do resíduo terminal e o C-4 do adjacente. Especificamente, cliva a ligação entre o átomo de carbono C-1 e o átomo de oxigênio glicosídico, e a configuração α em C-1 é conservada.



A glicose 1-fosfato liberada do glicogênio pode ser prontamente convertida em glicose 6-fosfato, um importante intermediário metabólico, pela enzima fosfoglicomutase.

A reação catalisada pela fosforilase é prontamente reversível *in vitro*. Em pH de 6,8 a razão de equilíbrio entre ortofosfato e glicose 1-fosfato é de 3,6. O valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ para essa reação é pequeno, visto que uma ligação glicosídica é substituída por uma ligação de fosforil éster, que tem um potencial de transferência quase igual. Entretanto, a fosforólise prossegue no sentido da degradação do glicogênio *in vivo*, visto que a razão [P_i]/glicose 1-fosfato] é habitualmente superior a 100, favorecendo substancialmente a fosforólise. Vemos aqui um exemplo de como a célula pode alterar a mudança de energia livre para favorecer a ocorrência de uma reação ao alterar a razão entre substrato e produto.

A clivagem fosforolítica do glicogênio é energeticamente vantajosa, visto que o açúcar liberado já está fosforilado. Em contrapartida, uma clivagem hidrolítica produziria glicose, que teria de ser então fosforilada à custa de uma molécula de ATP para entrar na via glicolítica. Uma vantagem adicional da clivagem fosforolítica para as células musculares é que não existe nenhum transportador para a glicose 1-fosfato, que apresenta carga negativa em condições fisiológicas, de modo que ela não pode ser transportada para fora da célula.

Mecanismo | O piridoxal fosfato participa da clivagem fosforolítica do glicogênio

O desafio especial enfrentado pela fosforilase consiste em clivar o glicogênio fosforoliticamente, e não por hidrólise, para economizar o ATP necessário para fosforilar a glicose livre. Assim, é necessário excluir a água do sítio ativo. A fosforilase é um dímero de duas subunidades idênticas de 97 kDa. Cada subunidade está enovelada de forma compacta em um *domínio aminoterminal* (480 resíduos) contendo um sítio de ligação de glicogênio e em um *domínio carboxiterminal* (360 resíduos; Figura 21.5). O sítio catalítico em cada subunidade está localizado em uma fenda profunda formada por resíduos de ambos os domínios. Qual a base mecanicista para a clivagem fosforolítica do glicogênio?

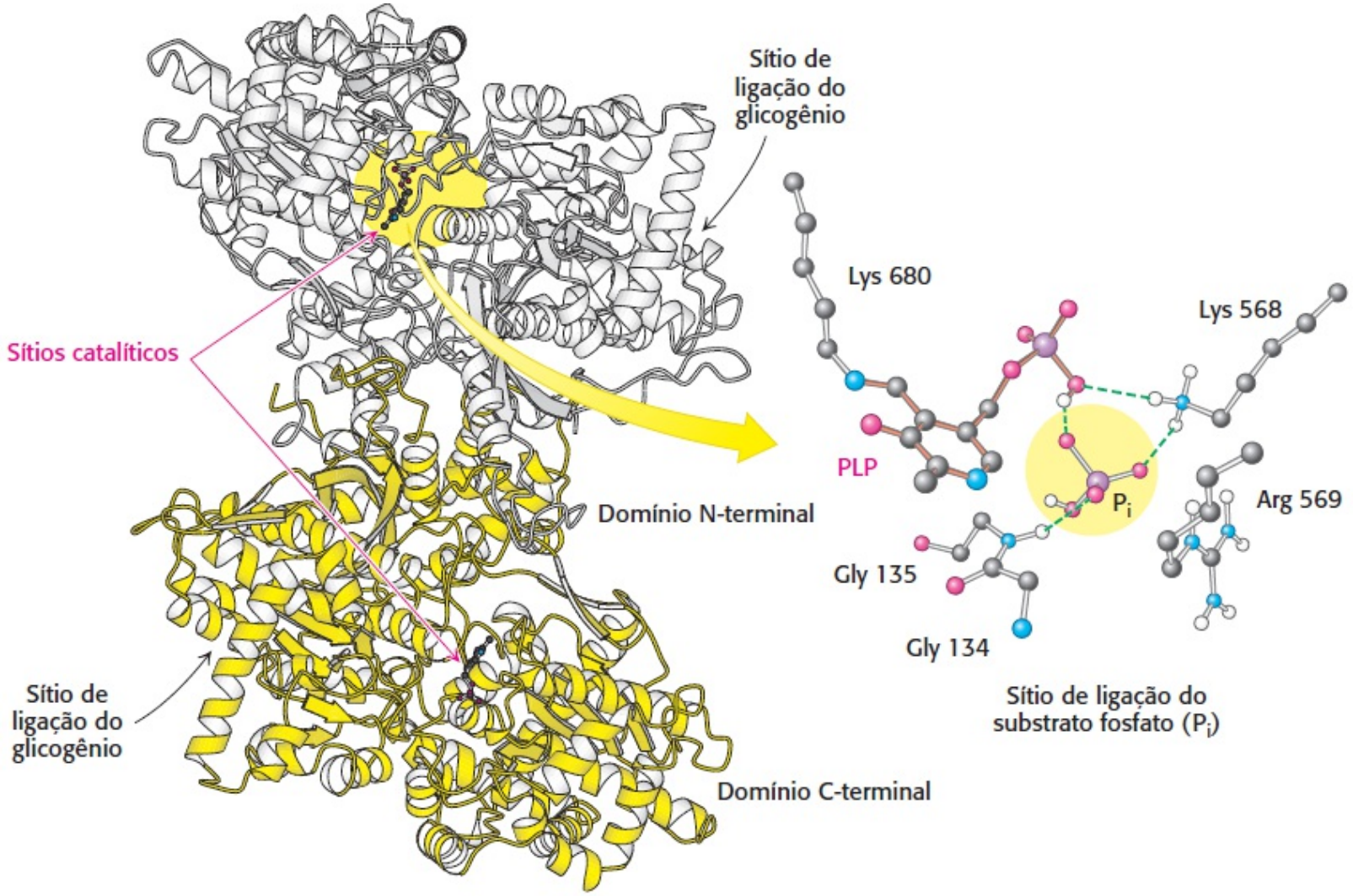


Figura 21.5 Estrutura da glicogênio fosforilase. Essa enzima forma um homodímero: uma subunidade é mostrada em branco, e a outra, em amarelo. Cada sítio catalítico inclui um grupo piridoxal fosfato (PLP) ligado à lisina 680 da enzima. A figura mostra o sítio de ligação para o substrato fosfato (P_i). *Observe* que o sítio catalítico situa-se entre o domínio C-terminal e o sítio de ligação do glicogênio. Uma fenda estreita, que se liga a quatro ou cinco unidades de glicose do glicogênio, conecta os dois sítios. Em virtude da separação dos sítios, o sítio catalítico é capaz de fosforilar várias unidades de glicose antes de a enzima se ligar novamente ao substrato glicogênio. [Desenhada a partir de 1NOI.pdb.]

Vários indícios sugerem um mecanismo pelo qual a fosforilase consegue a exclusão da água. Em primeiro lugar, tanto o substrato de glicogênio quanto o produto, a glicose 1-fosfato, apresentam uma configuração α em C-1. Um ataque direto pelo fosfato no C-1 de um açúcar inverteria a configuração desse átomo de carbono, visto que a reação prosseguiria através de um estado de transição pentacovalente. O fato de a glicose 1-fosfato formada ter uma configuração α e não β, sugere que é necessário um número par de etapas (no caso mais simples, duas). A explicação mais provável para esses resultados consiste na formação de um *intermediário íon carbônio* a partir do resíduo de glicose.

Um segundo indício para o metabolismo catalítico da fosforilase é a sua necessidade da coenzima *piridoxal fosfato* (PLP), um derivado da piridoxina (vitamina B_6, Seção 15.4). O grupo aldeído dessa coenzima forma uma ligação de base de Schiff com uma cadeia lateral de uma lisina específica da enzima (Figura 21.6). Estudos estruturais indicam que o grupo ortofosfato reagente assume uma posição entre o grupo 5′-fosfato do PLP e o substrato glicogênio (Figura 21.7). *O grupo 5′-fosfato do PLP atua em série com o ortofosfato como doador de prótons e, em seguida, como aceptor de prótons (i.e., como catalisador ácido-base geral)*. O ortofosfato (na forma de HPO_4^{2-}) doa um

próton para o átomo de oxigênio ligado ao carbono 4 da cadeia de glicogênio de saída e, simultaneamente, adquire um próton do PLP. O intermediário carbocátion (íon carbônio) formado nessa etapa é então atacado pelo ortofosfato, formando α-glicose 1-fosfato, com o retorno concomitante do átomo de hidrogênio para o piridoxal fosfato. O papel especial do piridoxal fosfato na reação é necessário, visto que a água é excluída do sítio ativo.

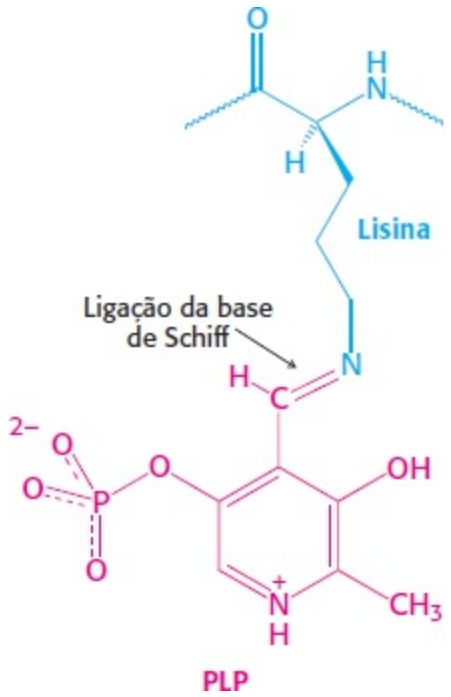


Figura 21.6 Ligação PLP-base de Schiff. Um grupo piridoxal fosfato (PLP) (em vermelho) forma uma base de Schiff com um resíduo de lisina (em azul) no sítio ativo da fosforilase.

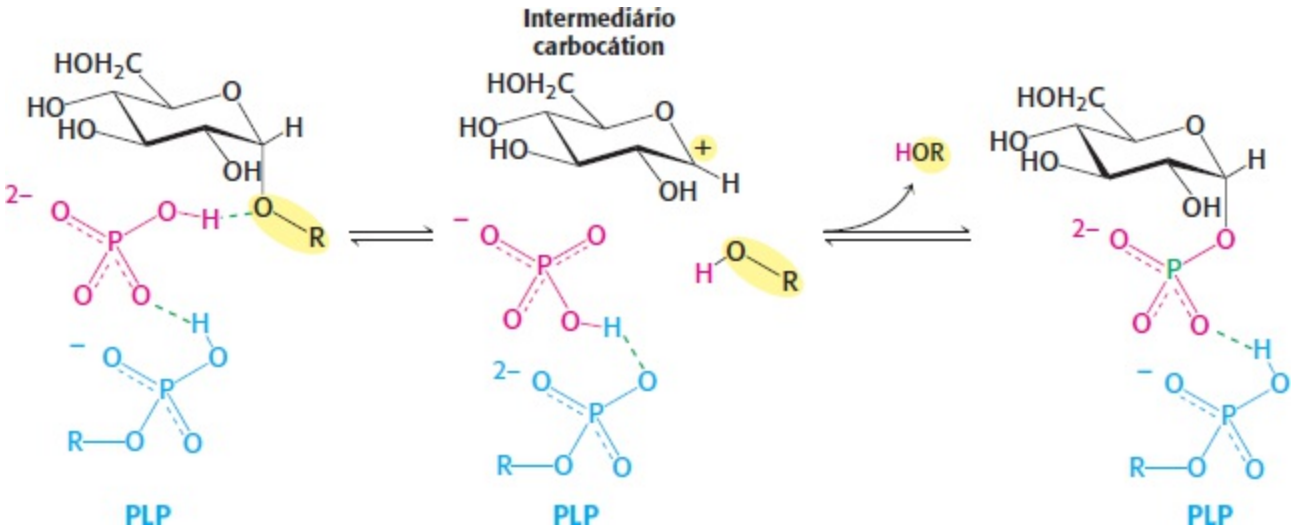


Figura 21.7 Mecanismo da fosforilase. Um grupo HPO_4^{2-} (em vermelho) favorece a clivagem da ligação glicosídica pela doação de um próton à glicose de saída (em preto). Essa reação resulta na formação de um carbocátion e é favorecida pela transferência de próton do grupo fosfato protonado do piridoxal fosfato (PLP) ligado (em azul). O carbocátion e o ortofosfato combinam-se para formar a glicose 1-fosfato.

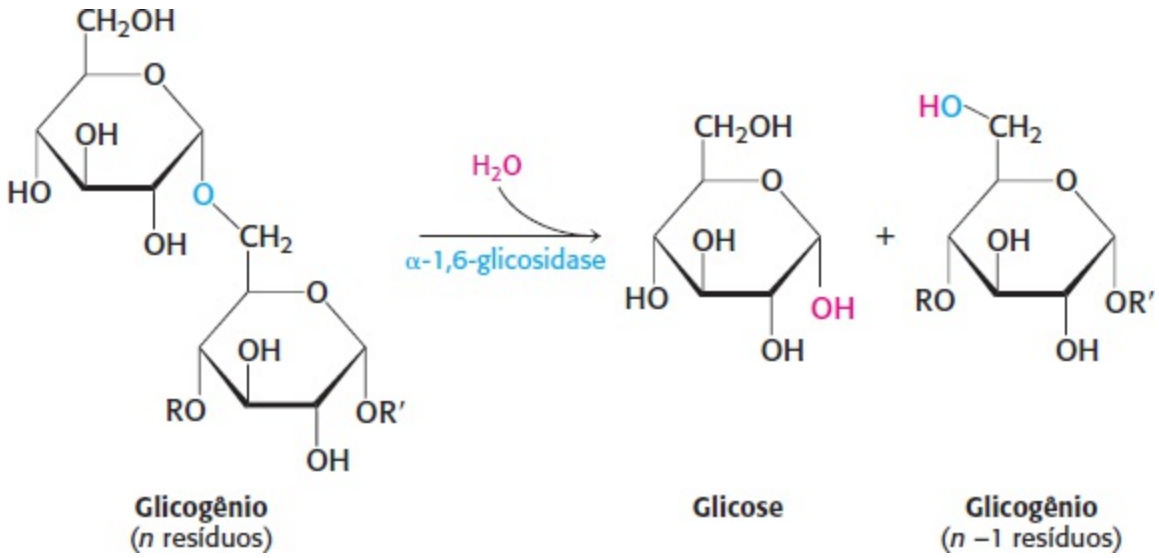
O sítio de ligação do glicogênio está a 30 Å de distância do sítio catalítico (Figura 21.5), porém está conectado ao sítio catalítico por uma fenda estreita capaz de acomodar quatro ou cinco unidades de glicose. A grande separação entre o sítio de ligação e o sítio catalítico possibilita a fosforilação de muitos resíduos pela enzima, sem a necessidade de se dissociar e reassociar depois de cada ciclo

catalítico. Uma enzima que pode catalisar muitas reações sem a necessidade de se dissociar e reassociar após cada etapa catalítica é denominada *processiva* – uma propriedade das enzimas que sintetizam e degradam grandes polímeros. Veremos novamente essas enzimas quando discutirmos a síntese do DNA e do RNA.

Uma enzima desramificadora também é necessária para a degradação do glicogênio

A degradação do glicogênio pela glicogênio fosforilase, atuando isoladamente, é limitada. A enzima é capaz de romper as ligações α-1,4-glicosídicas nas ramificações do glicogênio, porém depara-se logo com um obstáculo. As ligações α-1,6-glicosídicas nos pontos de ramificação não são suscetíveis à clivagem pela fosforilase. Com efeito, a fosforilase interrompe a clivagem das ligações α-1,4 quando alcança um resíduo terminal localizado a quatro resíduos de distância de um ponto de ramificação. Como cerca de 1 em 10 resíduos é ramificado, a clivagem exclusivamente pela fosforilase cessaria após a liberação de seis moléculas de glicose por ramificação.

Como o restante da molécula de glicogênio pode ser mobilizado para uso como fonte de energia? Duas enzimas adicionais, uma *transferase* e uma α-*1,6-glicosidase*, remodelam o glicogênio para continuar a degradação pela fosforilase (Figura 21.8). *A transferase desloca um bloco de três resíduos glicosil de uma ramificação externa para outra.* Essa transferência expõe um único resíduo de glicose unido por uma ligação glicosídica α-1,6. A α-1,6-glicosidase, também conhecida como enzima desramificadora, hidrolisa a ligação α-1,6-glicosídica.



Uma molécula de glicose livre é liberada e, em seguida, fosforilada pela enzima glicolítica, a hexoquinase. Por conseguinte, a transferase e a α 1-6 glicosidase convertem a estrutura ramificada em uma estrutura linear, preparando o caminho para a clivagem subsequente pela fosforilase. Nos eucariotos, as atividades de transferase e de α-1,6-glicosidase estão presentes em uma única cadeia polipeptídica de 160 kDa, fornecendo outro exemplo de enzima bifuncional (ver Figura 16.29).

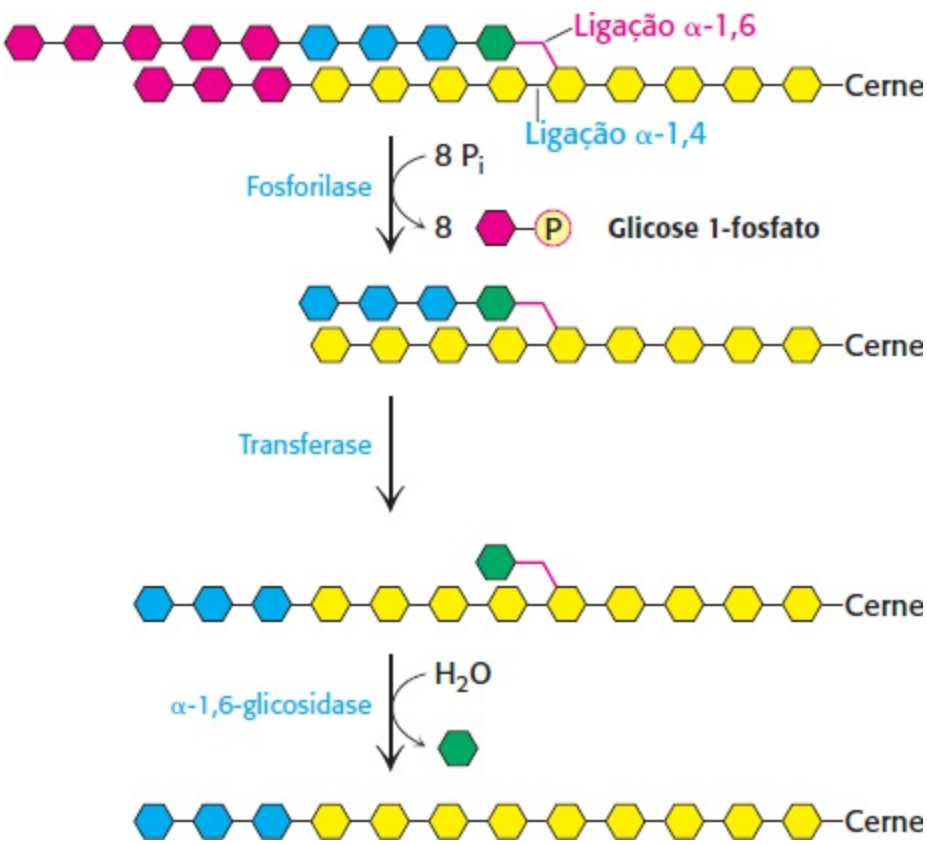


Figura 21.8 Remodelamento do glicogênio. Em primeiro lugar, as ligações glicosídicas α-1,4 em cada ramificação são clivadas pela fosforilase, deixando quatro resíduos de glicose em cada ramificação. A transferase desloca um bloco de três resíduos glicosil de uma ramificação externa para outra. Nessa reação, a ligação glicosídica α-1,4 entre os resíduos azul e verde é rompida, e forma-se uma nova ligação α-1,4 entre os resíduos azul e amarelo. O resíduo verde é então removido pela α-1,6-glicosidase, deixando uma cadeia linear com todas as ligações α-1,4 apropriadas para clivagem posterior pela fosforilase.

A fosfoglicomutase converte a glicose 1-fosfato em glicose 6-fosfato

A glicose 1-fosfato formada na clivagem fosforolítica do glicogênio precisa ser convertida em glicose 6-fosfato para entrar no fluxo metabólico principal. Esse deslocamento de um grupo fosforila é catalisado pela *fosfoglicomutase*. Convém lembrar que essa enzima também é utilizada no metabolismo da galactose (Seção 16.1). Para efetuar esse deslocamento, a enzima troca um grupo fosforila com o substrato (Figura 21.9). O sítio catalítico de uma molécula de mutase ativa contém um resíduo de serina fosforilada. O grupo fosforila é transferido do resíduo de serina para o grupo hidroxila em C-6 da glicose 1-fosfato, formando glicose 1,6-bifosfato. O grupo fosforila em C-1 desse intermediário é então transferido para o mesmo resíduo de serina, o que resulta na formação de glicose 6-fosfato e na regeneração da fosfoenzima.

Essas reações são semelhantes àquelas da *fosfoglicerato mutase*, uma enzima glicolítica (Seção 16.1). O papel da glicose 1,6-bifosfato na interconversão das fosfoglicoses é semelhante ao do 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG) na interconversão do 2-fosfoglicerato e 3-fosfoglicerato na glicólise. Uma fosfoenzima intermediária participa de ambas as reações.

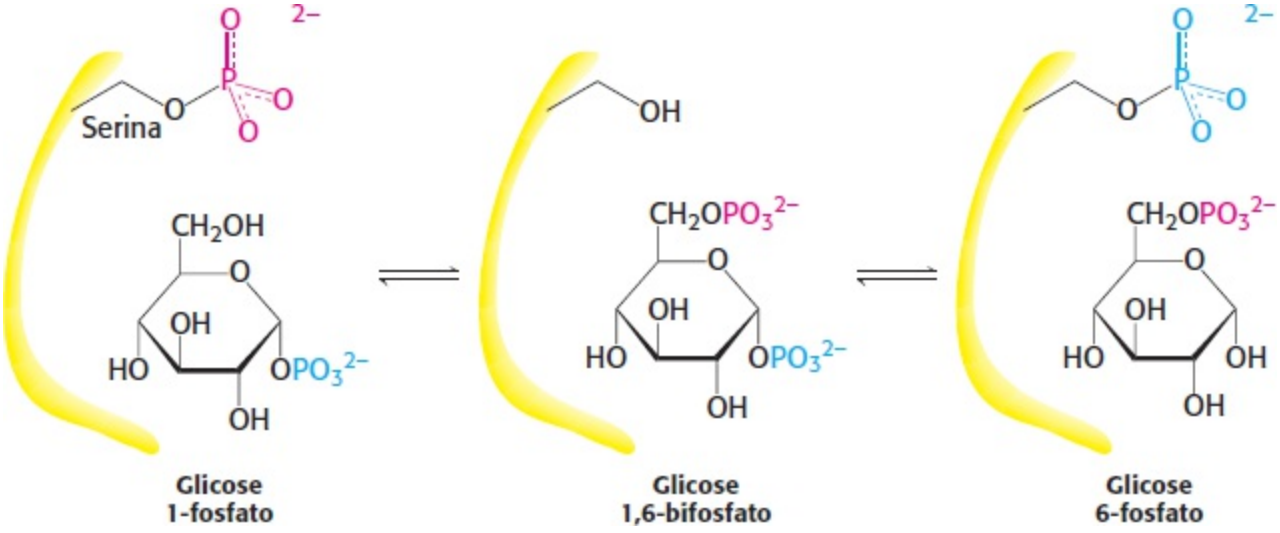


Figura 21.9 Reação catalisada pela fosfoglicomutase. Um grupo fosforila é transferido da enzima para o substrato, e um grupo fosforila diferente é transferido de volta para restaurar a enzima ao seu estado inicial.

O fígado contém glicose 6-fosfatase, uma enzima hidrolítica ausente no músculo.

Uma das principais funções do fígado consiste em manter um nível quase constante de glicose no sangue. O fígado libera glicose no sangue durante a atividade muscular e entre as refeições. A glicose liberada é captada principalmente pelo cérebro e pelo músculo esquelético. Entretanto, diferentemente da glicose não modificada, a glicose fosforilada produzida pela degradação do glicogênio não é transportada para fora das células. O fígado contém uma enzima hidrolítica, *a glicose 6-fosfatase*, que possibilita a saída da glicose do órgão. Essa enzima cliva o grupo fosforila, formando glicose livre e ortofosfato. Essa glicose 6-fosfatase é a mesma enzima que libera glicose livre no final da gliconeogênese. Localiza-se no lado luminal da membrana do retículo endoplasmático liso. Convém lembrar que a glicose 6-fosfato é transportada para dentro do retículo endoplasmático; a glicose e o ortofosfato formados pela hidrólise são então transportados de volta para o citoplasma (Seção 16.1).

$$\text{Glicose 6-fosfato} + H_2O \rightarrow \text{glicose} + P_i$$

A glicose 6-fosfatase está ausente na maioria dos outros tecidos. Os tecidos musculares conservam a glicose 6-fosfato para a produção de ATP. Em contraste, a glicose não constitui uma importante fonte de energia para o fígado.

21.2 A fosforilase é regulada por interações alostéricas e por fosforilação reversível

O metabolismo do glicogênio é controlado de modo preciso por múltiplos mecanismos interconectados. Esse controle tem como foco a enzima glicogênio fosforilase. *A fosforilase é regulada por vários efetores alostéricos, que sinalizam o estado energético da célula, bem como por fosforilação reversível, que responde a hormônios como a insulina, a epinefrina e o glucagon.* Examinaremos as diferenças no controle do metabolismo do glicogênio em dois tecidos: o músculo esquelético e o fígado. Essas diferenças devem-se ao fato de que *o músculo utiliza glicose para produzir a sua própria energia, enquanto o fígado mantém a homeostasia da glicose do organismo*

como um todo.

A fosforilase muscular é regulada pela mudança da carga energética intracelular

A fosforilase do músculo esquelético é um dímero que existe em duas formas interconversíveis: uma fosforilase *a habitualmente ativa* e uma fosforilase *b habitualmente inativa* (Figura 21.10). Cada uma dessas duas formas existe em equilíbrio entre um estado relaxado (R) ativo e um estado tenso (T) muito menos ativo, porém o equilíbrio para a fosforilase *a* favorece o estado R ativo, enquanto o equilíbrio para a fosforilase *b* favorece o estado T menos ativo (Figura 21.11). O estado padrão da fosforilase muscular é a forma *b*, devido ao fato de que, no músculo, a fosforilase precisa estar ativa durante a contração. A fosforilase *b* muscular é ativada pela presença de altas concentrações de AMP, que se liga um sítio de ligação de nucleotídios e estabiliza a fosforilação da fosforilase *b* no estado R ativo (Figura 21.12). Por conseguinte, quando ocorre contração muscular e o ATP é convertido em AMP, a fosforilase é sinalizada para degradar o glicogênio. O ATP atua como efetor alostérico negativo ao competir com o AMP. Por conseguinte, *a transição da fosforilase b entre o estado R ativo e o estado T menos ativo é controlada pela carga energética da célula muscular*. A glicose 6-fosfato também liga-se ao estado menos ativo da fosforilase *b* e o estabiliza, fornecendo um exemplo de inibição por retroalimentação. Na maioria das condições fisiológicas, *a fosforilase* b *é inativa, devido aos efeitos inibitórios do ATP e da glicose 6-fosfato.* Em contrapartida, *a fosforilase* a *é totalmente ativa*, independentemente dos níveis de AMP, ATP e glicose 6-fosfato. No músculo em repouso, quase toda a enzima encontra-se na forma *b* inativa.

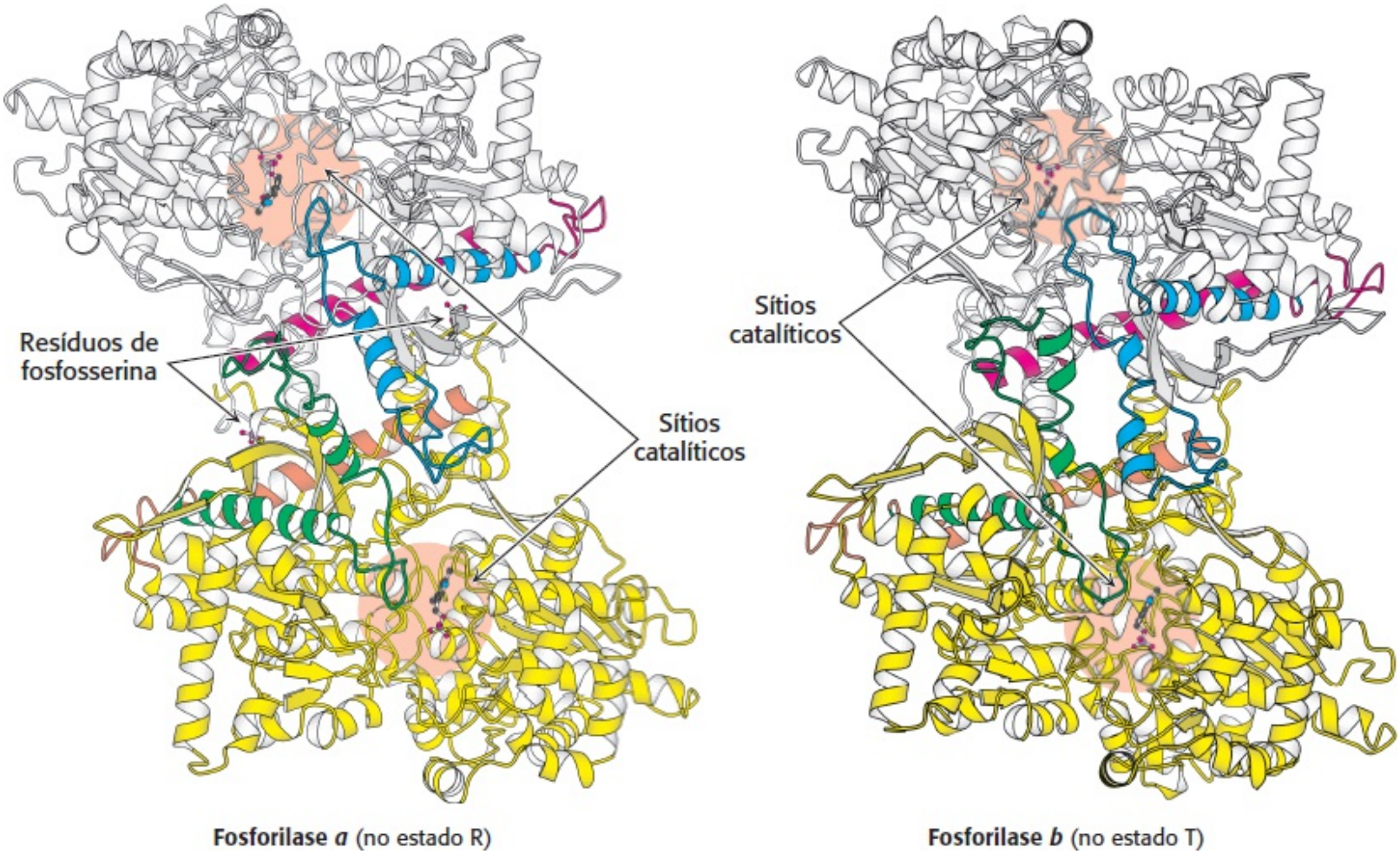


Figura 21.10 Estruturas da fosforilase *a* e da fosforilase *b*. A fosforilase *a* é fosforilada em serina 14 de cada

subunidade. Essa modificação favorece a estrutura do estado R mais ativo. Uma subunidade é mostrada em branco, com hélices e alças importantes para a regulação mostradas em azul e em vermelho. A outra subunidade é mostrada em amarelo, com as estruturas regulatórias em cor laranja e verde. A fosforilase *b* não é fosforilada e existe predominantemente no estado T. *Observe* que os sítios catalíticos estão em parte ocluídos no estado T. [Desenhada a partir de 1GPA.pdb e 1NOJ.pdb.]

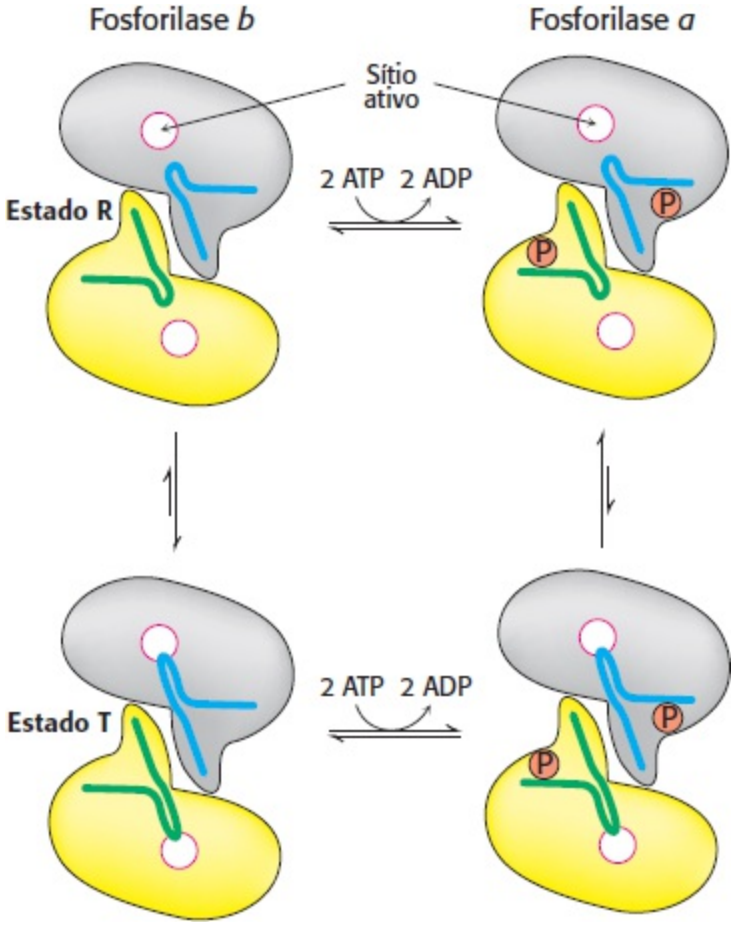


Figura 21.11 Regulação da fosforilase. Tanto a fosforilase *b* quanto a fosforilase *a* existem em equilíbrio entre o estado R ativo e o estado T menos ativo. A fosforilase *b* é habitualmente inativa, visto que o equilíbrio favorece o estado T. A fosforilase *a* é habitualmente ativa, visto que o equilíbrio favorece o estado R. As estruturas regulatórias são mostradas em azul e verde.

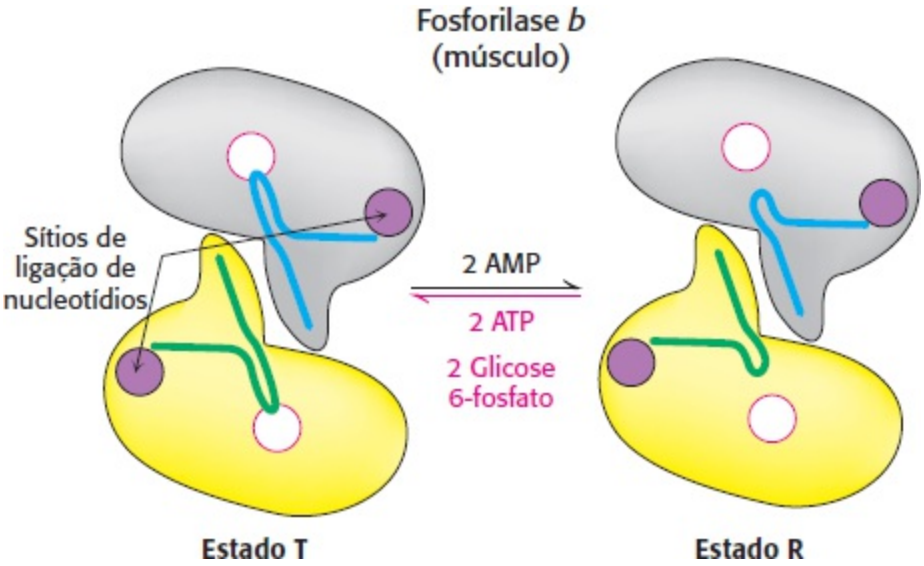


Figura 21.12 Regulação alostérica da fosforilase muscular. Uma baixa carga energética, representada por altas concentrações de AMP, favorece a transição para o estado R.

A fosforilase *b* é convertida em fosforilase *a* pela fosforilação de um único resíduo de serina (serina 14) em cada subunidade. Essa conversão é iniciada por hormônios. O medo ou a excitação do exercício provocam aumento dos níveis do hormônio epinefrina. O aumento dos níveis do hormônio e a estimulação elétrica do músculo resultam em fosforilação da enzima para a forma *a*. A enzima reguladora *fosforilase quinase* catalisa essa modificação covalente.

A comparação das estruturas da fosforilase *a* no estado R e da fosforilase *b* no estado T revela que alterações estruturais sutis nas interfaces das subunidades são transmitidas aos sítios ativos (Figura 21.10). A transição do estado T (o estado prevalente da fosforilase *b*) para o estado R (o estado prevalente da fosforilase *a*) acarreta uma rotação de 10° em torno do eixo duplo do dímero. De modo mais importante, essa transição está associada a alterações estruturais nas hélices α que movem uma alça para fora do sítio ativo de cada subunidade. Por conseguinte, o estado T é menos ativo, visto que o sítio catalítico está, em parte, bloqueado. No estado R, o sítio catalítico é mais acessível, e um sítio de ligação para o ortofosfato está bem organizado.

A fosforilase hepática produz glicose para utilização por outros tecidos

O papel da degradação do glicogênio no fígado consiste em produzir glicose para *exportação a outros tecidos*, quando o nível de glicemia está baixo. Por conseguinte, podemos considerar o estado padrão inicial da fosforilase hepática como sendo a forma *a*: a glicose precisa ser produzida, a não ser que a enzima receba uma sinalização diferente. Por conseguinte, a fosforilase *a* hepática exibe a transição R ↔ T mais responsiva (Figura 21.13). A ligação da glicose desloca a forma *a* do estado R ativo para o estado T menos ativo. Em essência, a enzima só retorna ao estado T de baixa atividade quando ela detecta a presença de glicose em quantidade suficiente. Se a glicose estiver presente na dieta alimentar, não há necessidade de degradar o glicogênio. Como veremos adiante, a presença da glicose também facilita a transição de *a* para *b*.

A regulação da fosforilase hepática difere daquela da fosforilase muscular. No músculo, o estado padrão é a forma *b*: não há necessidade de produzir glicose, a não ser que seja necessária a presença de energia. Conforme já discutido, o AMP desloca a forma *b* do músculo do estado T para R. Diferentemente da enzima muscular, a fosforilase hepática não é sensível á regulação pelo AMP, visto que o fígado não sofre as variações acentuadas de carga energética observadas no músculo em contração. Verificamos aqui um exemplo claro do uso de isoenzimas da mesma enzima para estabelecer as propriedades bioquímicas teciduais específicas do músculo e do fígado. Nos seres humanos, a sequência de aminoácidos da fosforilase hepática e muscular têm aproximadamente 90% de identidade; contudo, a diferença de 10% resulta em deslocamentos sutis, porém importantes, na estabilidade das várias formas da enzima.

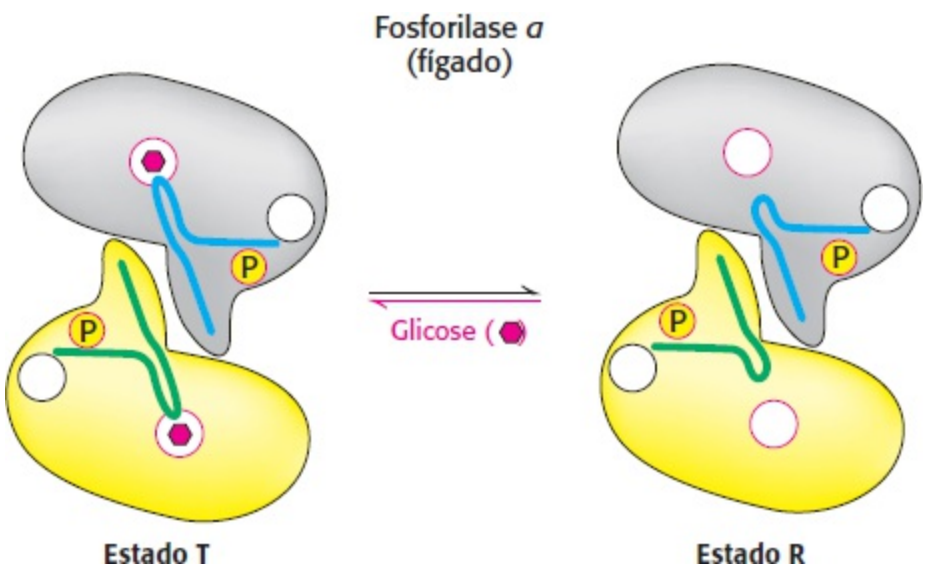


Figura 21.13 Regulação alostérica da fosforilase hepática. A ligação da glicose à fosforilase *a* desloca o equilíbrio para o estado T e inativa a enzima. Por conseguinte, o glicogênio não é mobilizado quando a glicose já está presente em quantidades abundantes.

A fosforilase quinase é ativada por fosforilação e por íons cálcio

A fosforilase quinase ativa a fosforilase *b* pela sua ligação a um grupo fosforila. A composição de subunidades da fosforilase quinase no músculo esquelético é $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$, e a massa dessa proteína muito grande é de 1.200 kDa. A atividade catalítica reside na subunidade γ, enquanto as outras subunidades desempenham funções reguladoras. Essa quinase encontra-se sob controle duplo: é ativada tanto por fosforilação, pela proteína quinase A (PKA), quanto por elevações dos níveis de Ca^{2+} (Figura 21.14). À semelhança de seu próprio substrato, *a fosforilase quinase é ativada por fosforilação: a quinase é convertida de uma forma de baixa atividade em uma forma de alta atividade por fosforilação de sua subunidade* β. A ativação da fosforilase quinase constitui uma etapa de uma cascata de transdução de sinais iniciada por hormônios.

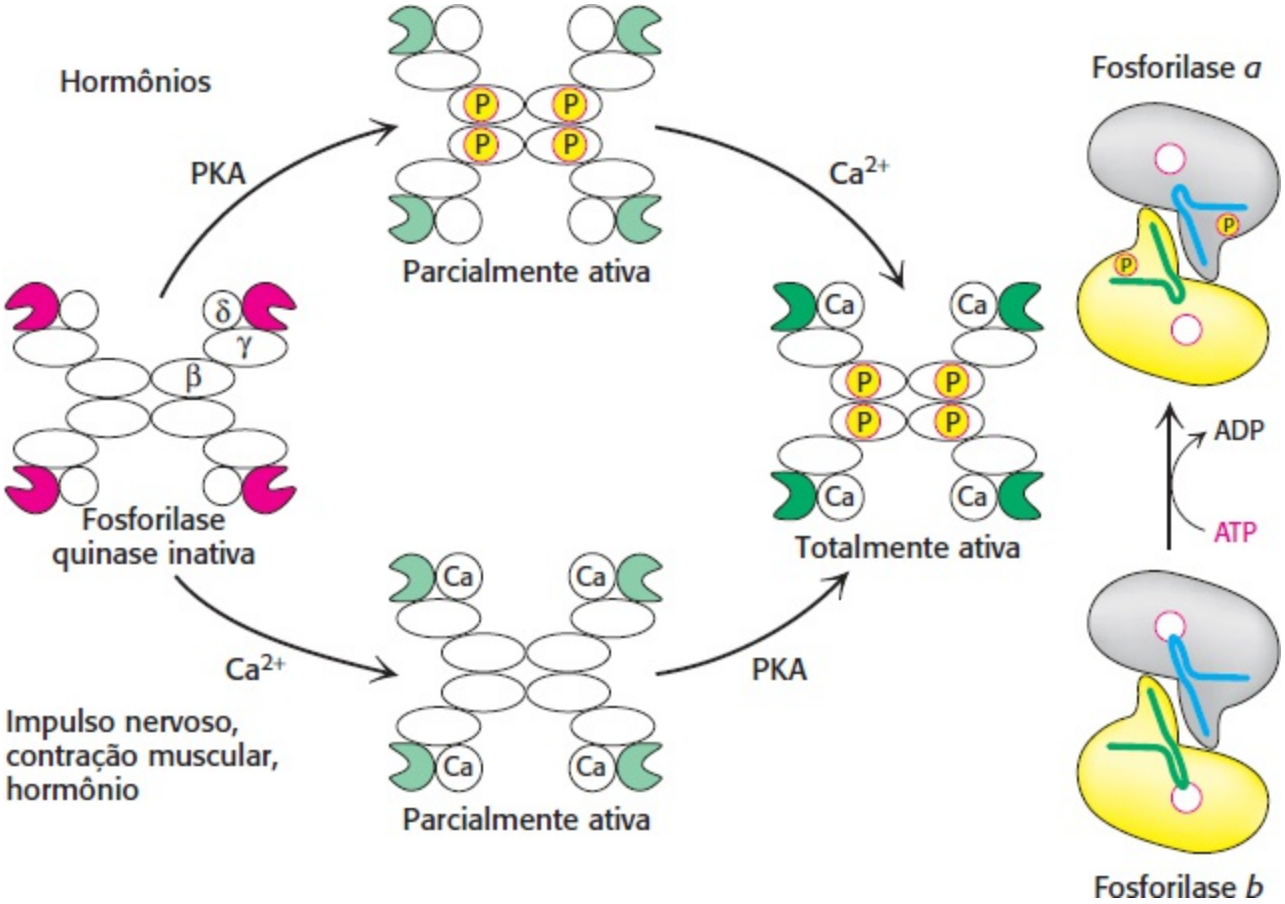


Figura 21.14 Ativação da fosforilase quinase. A fosforilase quinase, uma montagem $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$, é ativada por hormônios que levam à fosforilação da subunidade β e pela ligação do Ca^{2+} à subunidade δ. Ambos os tipos de estimulação são necessários para a atividade máxima da enzima. Quando ativa, a enzima converte a fosforilase *b* em fosforilase *a*.

A fosforilase quinase também pode ser parcialmente ativada por níveis de Ca^{2+} da ordem de 1 μM. Sua subunidade δ é a *calmodulina*, um sensor de cálcio que estimula muitas enzimas nos eucariotos. Esse modo de ativação da quinase é particularmente notável no músculo, onde a contração é deflagrada pela liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. A fosforilase quinase só alcança a sua atividade máxima após a fosforilação da subunidade β e a ativação da subunidade δ pela ligação do Ca^{2+}.

21.3 A epinefrina e o glucagon sinalizam a necessidade de degradação do glicogênio

A proteína quinase A ativa a fosforilase quinase que, por sua vez, ativa a glicogênio fosforilase. O que ativa a proteína quinase A? Qual é o sinal que, em última analise, desencadeia um aumento na degradação do glicogênio?

As proteínas G transmitem o sinal para o início da degradação do glicogênio

Vários hormônios afetam acentuadamente o metabolismo do glicogênio. O glucagon e a epinefrina desencadeiam a degradação do glicogênio. A atividade muscular ou a sua antecipação levam à liberação de *epinefrina* (*adrenalina*), uma catecolamina derivada da tirosina da medula suprarrenal. A epinefrina estimula acentuadamente a degradação do glicogênio no músculo e, em menor grau, no fígado. O fígado é mais responsivo ao *glucagon*, um hormônio polipeptídico secretado pelas células

α do pâncreas, quando o nível de glicemia está baixo. Fisiologicamente, o glucagon significa um estado de fome (jejum) (Figura 21.15).

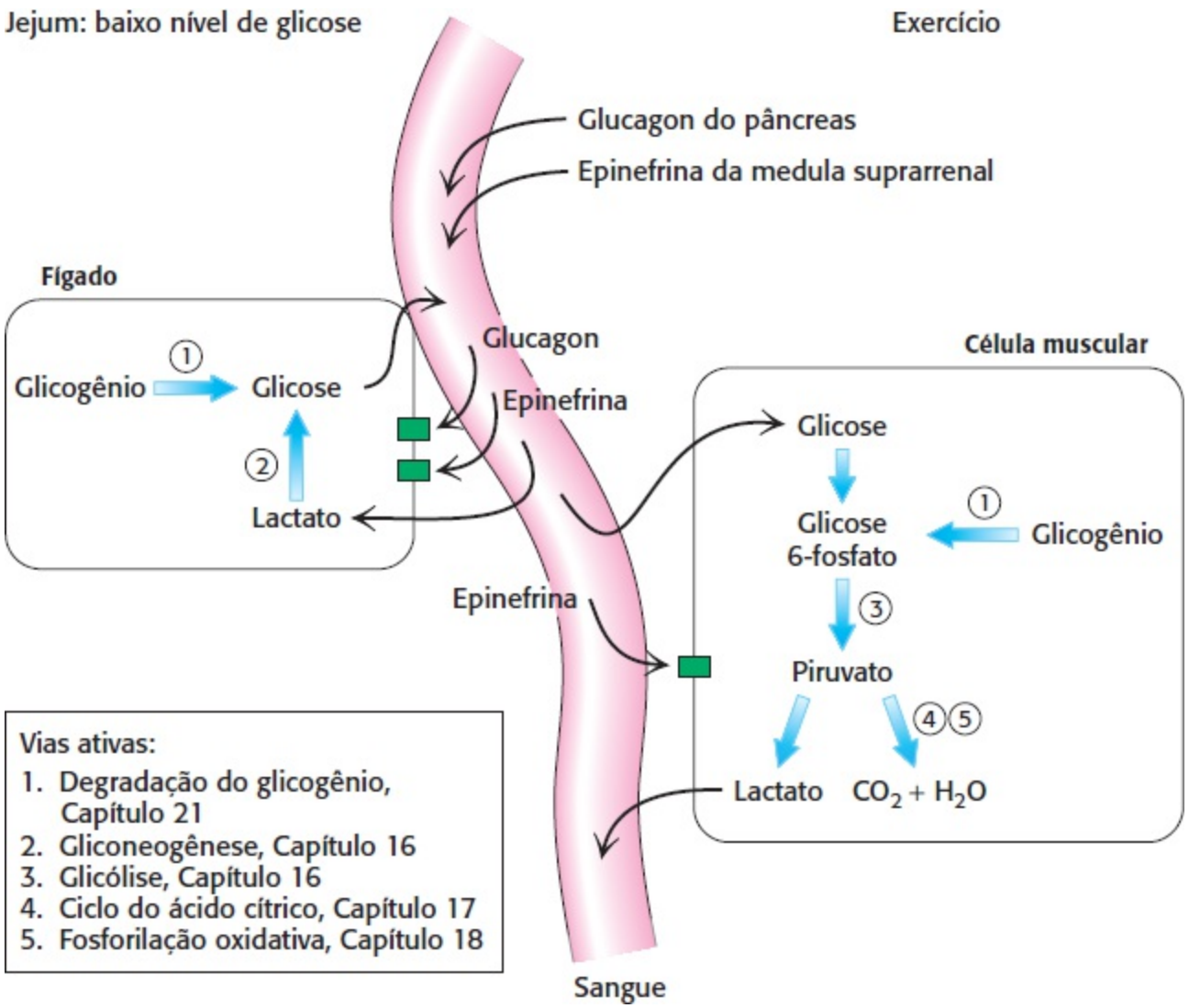


Figura 21.15 Integração das vias: controle hormonal da degradação de glicogênio. O glucagon estimula a degradação do glicogênio hepático quando o nível de glicemia está baixo. A epinefrina potencializa a degradação do glicogênio no músculo e no fígado, fornecendo energia para a contração do músculo.

Como os hormônios desencadeiam a degradação do glicogênio? Eles iniciam uma cascata de transdução de sinais do AMP cíclico, que já foi discutida na seção 16.1 (Figura 21.16).

1. As moléculas de sinalização, epinefrina e glucagon, ligam-se a receptores específicos que atravessam sete vezes a membrana (7TM) na membrana plasmática das células-alvo (Seção 14.1). A epinefrina liga-se ao receptor β-adrenérgico no músculo, enquanto o glucagon liga-se ao receptor de glucagon no fígado. Esses eventos de ligação ativam a proteína G_S. *Um sinal externo específico foi transmitido para dentro da célula por meio de alterações estruturais*, inicialmente no receptor e, em seguida, na proteína G.

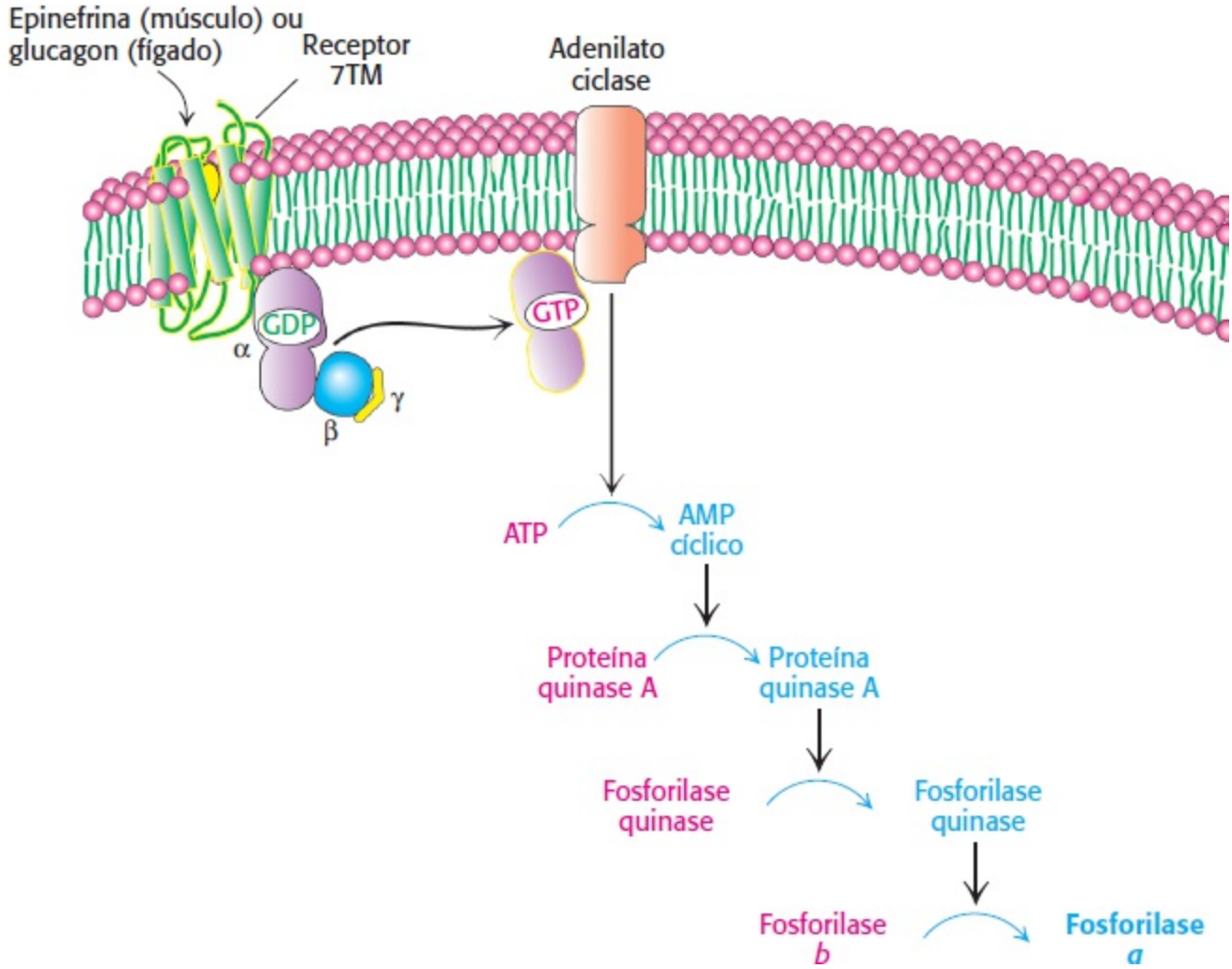
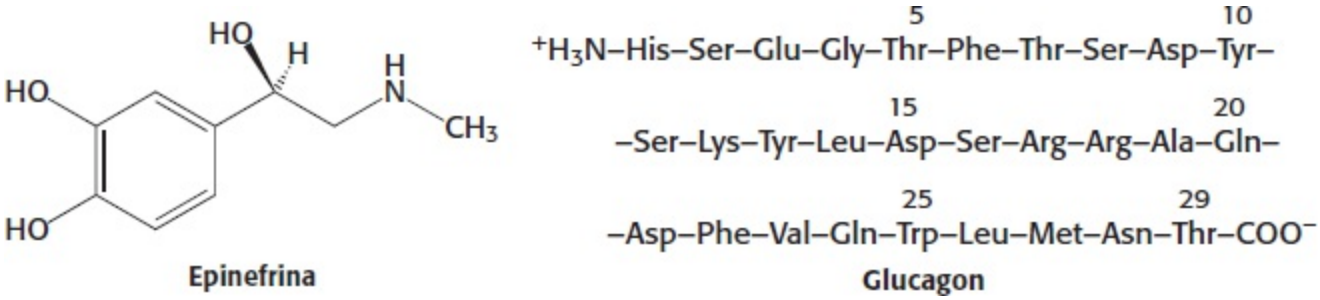


Figura 21.16 Cascata reguladora para a degradação do glicogênio. A degradação do glicogênio é estimulada pela ligação de hormônios a receptores 7TM. A ligação do hormônio inicia uma via de transdução de sinais dependentes de proteína G, que resulta na fosforilação e ativação da glicogênio fosforilase.



2. A subunidade da G_S ligada ao GTP ativa a proteína transmembranar, adenilato ciclase. Essa enzima catalisa a formação do segundo mensageiro, o AMP cíclico, a partir de ATP.

3. O nível citoplasmático elevado de AMP cíclico ativa a *proteína quinase* A (Seção 10.3). A ligação do AMP cíclico às subunidades regulatórias inibitórias desencadeia a sua dissociação das subunidades catalíticas. As subunidades catalíticas livres estão agora ativas.

4. A proteína quinase A fosforila a fosforilase quinase inicialmente na subunidade β e, em seguida, na subunidade α, ativando subsequentemente a glicogênio fosforilase.

A cascata do AMP cíclico amplifica acentuadamente os efeitos de hormônios. A ligação de uma

pequena quantidade de moléculas de hormônio aos receptores de superfície celular leva à liberação de uma quantidade muito grande de unidades de açúcar. Com efeito, grande parte do glicogênio armazenado seria mobilizada dentro de segundos se não houvesse um sistema contrarregulador.

Os processos de transdução de sinais no fígado são mais complexos do que no músculo. A epinefrina também induz a degradação do glicogênio no fígado. Entretanto, além de sua ligação ao receptor β-adrenérgico, a epinefrina liga-se ao receptor α-adrenérgico 7TM que então inicia a *cascata do fosfoinositídio* (Seção 14.2), que induz a liberação de Ca^{2+} das reservas do retículo endoplasmático. Convém lembrar que a subunidade δ da fosforilase quinase é a calmodulina, um sensor de Ca^{2+}. A ligação do Ca^{2+} à calmodulina provoca a ativação parcial da fosforilase quinase. A estimulação pelo glucagon e pela epinefrina leva à mobilização máxima do glicogênio hepático.

A degradação do glicogênio precisa ser rapidamente interrompida, quando necessário

É preciso haver uma maneira de interromper rapidamente o sistema de alto ganho da degradação do glicogênio, a fim de evitar a depleção devastadora do glicogênio após suprir as necessidades energéticas. Quando as necessidades de glicose são preenchidas, a fosforilase quinase e a glicogênio fosforilase são desfosforiladas e inativadas. Simultaneamente, a síntese de glicogênio é ativada.

A via de transdução de sinais que leva à ativação da glicogênio fosforilase é interrompida automaticamente quando o hormônio desencadeante não está mais presente. A atividade inerente de GTPase da proteína G transforma o GTP ligado em GDP inativo, e as fosfodiesterases sempre presentes na célula convertem o AMP cíclico em AMP. A proteína fosfatase 1 (PP1) remove os grupos fosforila da fosforilase quinase, inativando, assim, a enzima. Por fim, a proteína fosfatase 1 também remove o grupo fosforila da glicogênio fosforilase, convertendo a enzima na forma *b* habitualmente inativa.

A regulação da glicogênio fosforilase tornou-se mais sofisticada com a evolução da enzima

As análise das estruturas primárias da glicogênio fosforilase de seres humanos, ratos, *Dictyostelium* (micetozoário), leveduras, batatas e *E. coli* levaram a inferências a cerca da evolução dessa enzima importante. Os 16 resíduos que entram em contato com a glicose no sítio ativo são idênticos em quase todas as enzimas. Há maior variação, porém uma conservação ainda substancial dos 15 resíduos no sítio de ligação do piridoxal fosfato. De forma semelhante, o sítio de ligação do glicogênio é bem conservado em todas as enzimas. O alto grau de similaridade entre esses três sítios mostra que o mecanismo catalítico foi mantido durante toda a evolução.

Entretanto, surgem diferenças quando comparamos os sítios regulatórios. O tipo mais simples de regulação seria a inibição por retroalimentação pela glicose 6-fosfato. Com efeito, o sítio regulatório da glicose 6-fosfato é altamente conservado na maioria das fosforilases. Os resíduos de aminoácidos cruciais que participam na regulação pela fosforilação e ligação de nucleotídios são bem conservados apenas nas enzimas de mamíferos. Por conseguinte, esse nível de regulação foi uma aquisição evolutiva mais tardia.

21.4 O glicogênio é sintetizado e degradado por vias diferentes

À semelhança da glicólise e da gliconeogênese, as vias de biossíntese e de degradação raramente operam exatamente pelas mesmas reações em sentido direto e inverso. O metabolismo do glicogênio forneceu o primeiro exemplo conhecido desse princípio importante. *Vias separadas possibilitam flexibilidade muito maior, tanto no nível energético quanto de controle.*

Em 1957, Luis Leloir e colaboradores mostraram que o glicogênio é sintetizado por uma via que utiliza *uridina difosfato glicose* (UDP-glicose), em lugar de glicose 1-fosfato, como doador de glicose ativada.

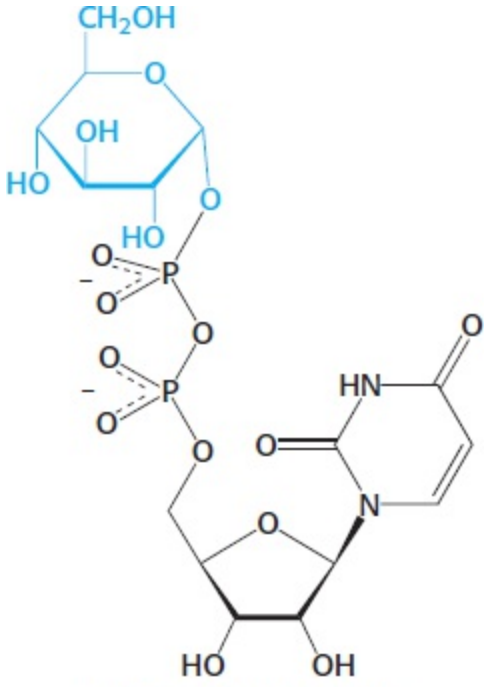
$$\text{Síntese: glicogênio}_n + \text{UDP-glicose} \rightarrow \text{glicogênio}_{n+1} + \text{UDP}$$

$$\text{Degradação: glicogênio}_{n+1} + P_i \rightarrow \text{glicogênio}_n + \text{glicose 1-fosfato}$$

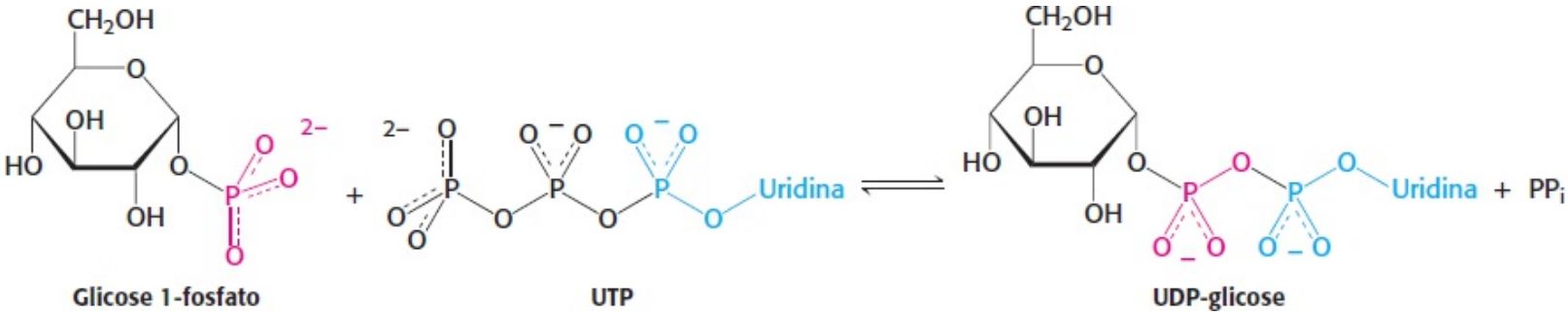
A UDP-glicose é uma forma ativada de glicose

A UDP-glicose, o doador de glicose na biossíntese de glicogênio, é uma *forma ativada de glicose*, assim como o ATP e a acetil-CoA são, respectivamente, formas ativadas de ortofosfato e acetato. O átomo de carbono C-1 da unidade glicosil da UDP-glicose é ativado, visto que o grupo hidroxila é esterificado ao componente difosfato do UDP.

A UDP-glicose é sintetizada a partir da glicose 1-fosfato e da uridina trifosfato (UTP), em uma reação catalisada pela *UDP-glicose pirofosforilase*. Essa reação libera os dois resíduos fosforila externos da UTP na forma de pirofosfato.



Uridina difosfato glicose (UDP-glicose)



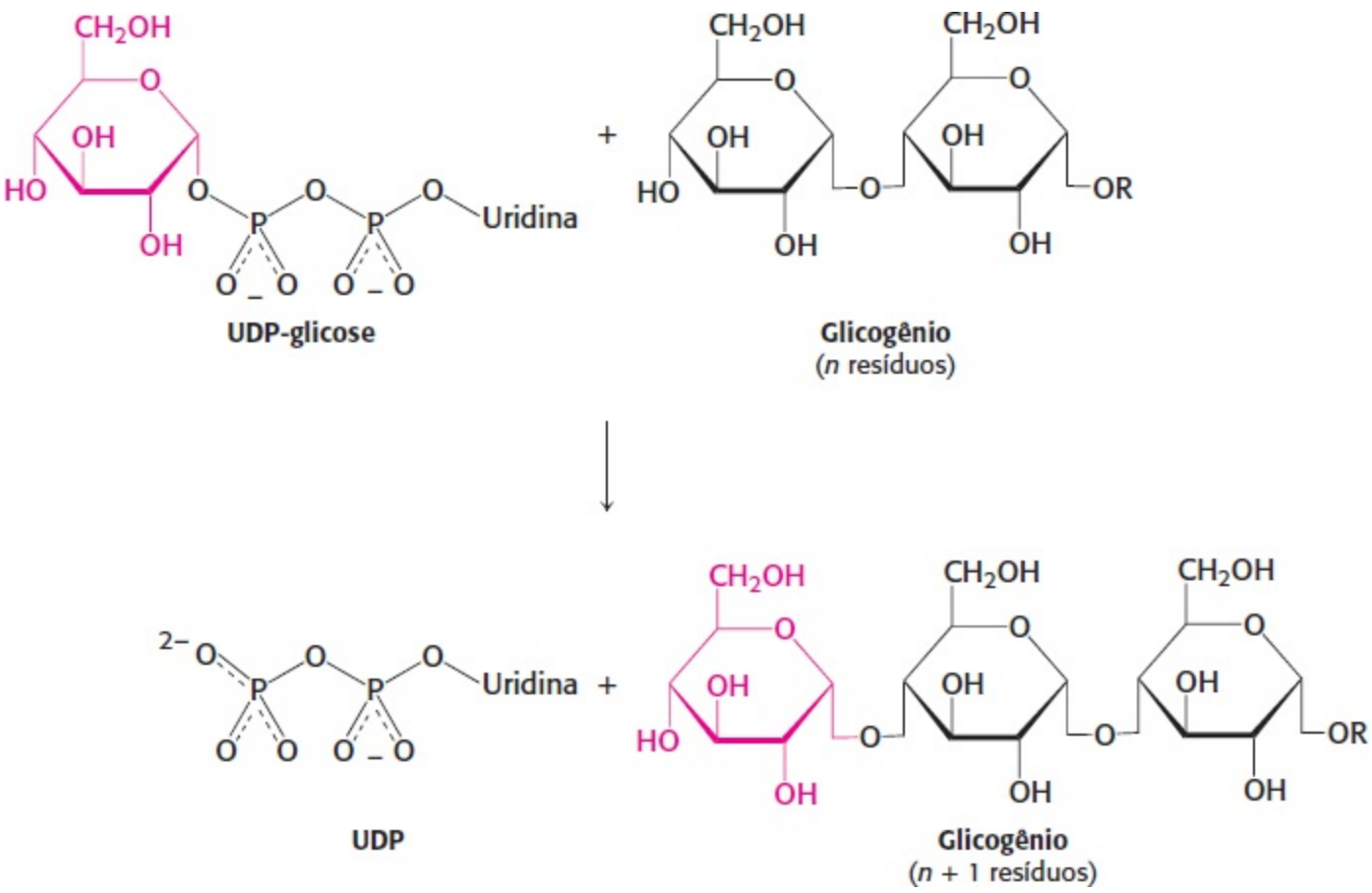
Essa reação é prontamente reversível. Entretanto, o pirofosfato sofre hidrólise *in vivo* a ortofosfato por uma pirofosfatase inorgânica. A hidrólise essencialmente irreversível do pirofosfato impulsiona a síntese de UDP-glicose.

$$\begin{array}{r} \text{Glicose 1-fosfato} + \text{UTP} \rightleftharpoons \text{UDP-glicose} + \text{PP}_i \\ \text{PP}_i + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2\,\text{P}_i \\ \hline \text{Glicose 1-fosfato} + \text{UTP} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{UDP-glicose} + 2\,\text{P}_i \end{array}$$

A síntese de UDP-glicose é um exemplo de outro tema recorrente em bioquímica: *muitas reações de biossíntese são impulsionadas pela hidrólise do pirofosfato.*

A glicogênio sintase catalisa a transferência de glicose da UDP-glicose para uma cadeia em crescimento

Novas unidades glicosil são acrescentadas aos resíduos terminais não redutores do glicogênio. A unidade glicosil ativada da UDP-glicose é transferida ao grupo hidroxila em C-4 de um resíduo terminal para formar uma ligação glicosídica α-1,4. A UDP é deslocada pelo grupo hidroxila terminal da molécula de glicogênio em crescimento. Essa reação é catalisada pela *glicogênio sintase, a enzima reguladora essencial na síntese de glicogênio.*



A glicogênio sintase só pode acrescentar resíduos glicosil a uma cadeia de polissacarídio que já contém mais de quatro resíduos. Por conseguinte, a síntese de glicogênio necessita de um *iniciador* (*primer*). Essa função de iniciador é desempenhada pela glicogenina, uma glicosiltransferase (ver Figura 11.25) constituída de duas subunidades idênticas de 37 kDa. Cada subunidade da glicogenina catalisa a adição de oito unidades glicosil a outra subunidade. Essas unidades glicosil formam polímeros curtos de α-1,4-glicose, que se ligam de modo covalente ao grupo hidroxila fenólico de um resíduo de tirosina específico em cada subunidade de glicogenina. A UDP-glicose é o doador nessa autoglicosilação. Nesse ponto, a glicogênio sintase passa a atuar para estender a molécula de glicogênio. Por conseguinte, cada molécula de glicogênio apresenta uma molécula de glicogenina em seu cerne (ver Figura 21.1).

Apesar de não haver nenhuma semelhança de sequência detectável, os estudos estruturais revelaram que a glicogênio sintase é homóloga à glicogênio fosforilase. O sítio de ligação para a UDP-glicose na glicogênio sintase corresponde, na sua posição, ao piridoxal fosfato na glicogênio fosforilase.

Uma enzima ramificadora forma as ligações α-1,6

A glicogênio sintase só catalisa a síntese de ligações α-1,4. Outra enzima é necessária para formar as ligações α-1,6 que fazem do glicogênio um polímero ramificado. A ramificação ocorre após a ligação α-1,4 de vários resíduos glicosil pela glicogênio sintase (Figura 21.17). Uma ramificação é criada pela quebra de uma ligação α-1,4 e a formação de uma ligação α-1,6: essa reação é diferente da desramificação. Um bloco de resíduos, tipicamente em número de 7, é transferido para um local mais interno. A *enzima ramificadora* que catalisa essa reação requer que o bloco de 7 ou mais

resíduos inclua o terminal não redutor e provenha de uma cadeia com pelo menos 11 resíduos de comprimento. Além disso, o novo ponto de ramificação precisa ter pelo menos 4 resíduos de distância de um preexistente.

A ramificação é importante, visto que ela aumenta a solubilidade do glicogênio. Além disso, a ramificação cria um grande número de tecidos terminais, que são os locais de ação da glicogênio fosforilase e da sintase (Figura 21.18). Por conseguinte, a ramificação aumenta a velocidade de síntese e de degradação do glicogênio.

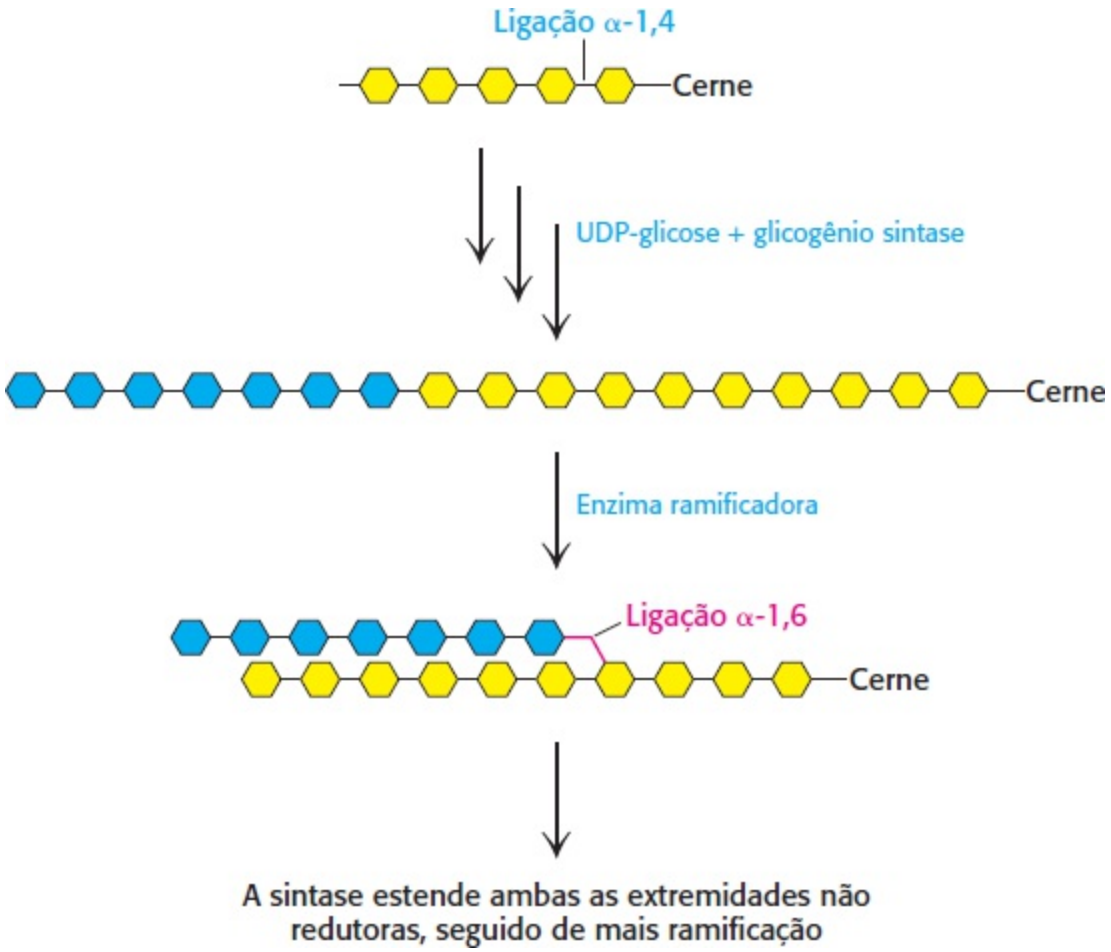


Figura 21.17 Reação de ramificação. A enzima ramificadora remove um oligossacarídio de aproximadamente sete resíduos da extremidade não redutora e cria uma ligação α-1,6 interna.

A ramificação do glicogênio requer uma única atividade de transferase. A desramificação necessita de duas atividades enzimáticas: uma transferase e uma α-1,6-glicosidase. A análise de sequência sugere que as duas transferases e, talvez, a α-1,6-glicosidase sejam membros da mesma família de enzimas, denominada família da α-amilase. As enzimas dessa família catalisam uma reação pela formação de um intermediário covalente ligado a um resíduo de aspartato conservado. Por conseguinte, a enzima ramificadora parece transferir uma cadeia de moléculas de glicose de uma ligação α-1,4 para um resíduo de aspartato na enzima e, a seguir, deste sítio para um local mais interno da molécula de glicogênio formando uma ligação α-1,6.

A glicogênio sintase é a enzima reguladora principal na síntese de glicogênio

A atividade da glicogênio sintase, à semelhança da atividade da fosforilase, é regulada por modificação covalente. A glicogênio sintase é fosforilada em diversos sítios por várias proteína

quinases, notavelmente pela proteína quinase A e *glicogênio sintase quinase* (GSK). A consequente alteração nas cargas da proteína causa sua inativação. *A fosforilação tem efeitos opostos sobre as atividades enzimáticas da glicogênio sintase e da fosforilase*. A fosforilação converte a forma *a* ativa da sintase em uma forma *b* habitualmente inativa. A forma *b* fosforilada só é ativa na presença de um alto nível do ativador alostérico, a glicose 6-fosfato, enquanto a forma *a* é ativa independentemente da presença de glicose 6-fosfato.

O glicogênio é uma forma de armazenamento eficiente da glicose

Qual o custo da conversão da glicose 6-fosfato em glicogênio e de volta a glicose 6-fosfato? As reações pertinentes já foram descritas, exceto a reação 5, que consiste na regeneração da UTP. O ATP fosforila a UDP em uma reação catalisada pela *nucleosídio difosfoquinase*.

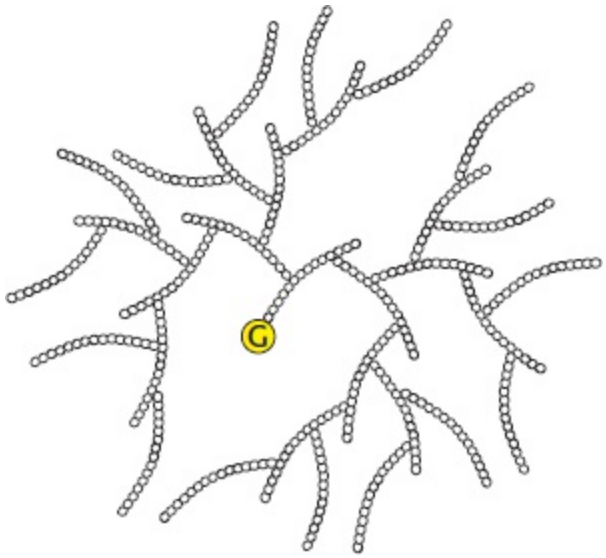


Figura 21.18 Corte transversal de uma molécula de glicogênio. O componente designado por G é a glicogenina.

$$\text{Glicose 6-fosfato} \rightarrow \text{glicose 1-fosfato} \quad (1)$$

$$\text{Glicose 1-fosfato} + \text{UTP} \rightarrow \text{UDP-glicose} + PP_i \quad (2)$$

$$PP_i + H_2O \rightarrow 2\ P_i \quad (3)$$

$$\text{UDP-glicose} + \text{glicogênio}_n \rightarrow \text{glicogênio}_{n+1} + \text{UDP} \quad (4)$$

$$\text{UDP} + \text{ATP} \rightarrow \text{UTP} + \text{ADP} \quad (5)$$

Soma: $\text{glicose 6-fosfato} + \text{ATP} + \text{glicogênio}_n + H_2O \rightarrow$

$$\text{glicogênio}_{n+1} + \text{ADP} + 2\ P_i$$

Assim, uma molécula de ATP é hidrolisada para incorporar a glicose 6-fosfato ao glicogênio. O rendimento energético da degradação do glicogênio é altamente eficiente. Cerca de 90% dos resíduos sofrem clivagem fosforolítica a glicose 1-fosfato, que é convertida sem custo em glicose 6-fosfato. Os outros 10% consistem em resíduos de ramificação, que são clivados por hidrólise. Em seguida, uma molécula de ATP é usada para fosforilar cada uma dessas moléculas de glicose a glicose 6-fosfato. A oxidação completa da glicose 6-fosfato produz cerca de 31 moléculas de ATP, e o armazenamento consome um pouco mais do que uma molécula de ATP por molécula de glicose 6-fosfato; por conseguinte, *a eficiência global do armazenamento é de quase 97%.*

21.5 A degradação e a síntese de glicogênio são reguladas de modo recíproco

Um mecanismo importante de controle impede que o glicogênio seja sintetizado ao mesmo tempo que é degradado. *As mesmas cascatas de cAMP desencadeadas pelo glucagon e pela epinefrina, que iniciam a degradação do glicogênio no fígado e no músculo, respectivamente, também interrompem a síntese de glicogênio. O glucagon e a epinefrina controlam tanto a degradação quanto a síntese de glicogênio por meio da proteína quinase A* (Figura 21.19). Convém lembrar que a proteína quinase A acrescenta um grupo fosforila à fosforilase quinase, ativando a enzima e iniciando o processo de degradação do glicogênio. De modo semelhante, a proteína quinase A acrescenta um grupo fosforila à glicogênio sintase, porém essa fosforilação leva a *diminuição* da atividade enzimática. Outras quinases, como a glicogênio sintase quinase, ajudam a inativar a sintase. Dessa maneira, a degradação e a síntese de glicogênio são reguladas de modo recíproco. Como a atividade enzimática é revertida de modo que a degradação de glicogênio seja interrompida e comece a sua síntese?

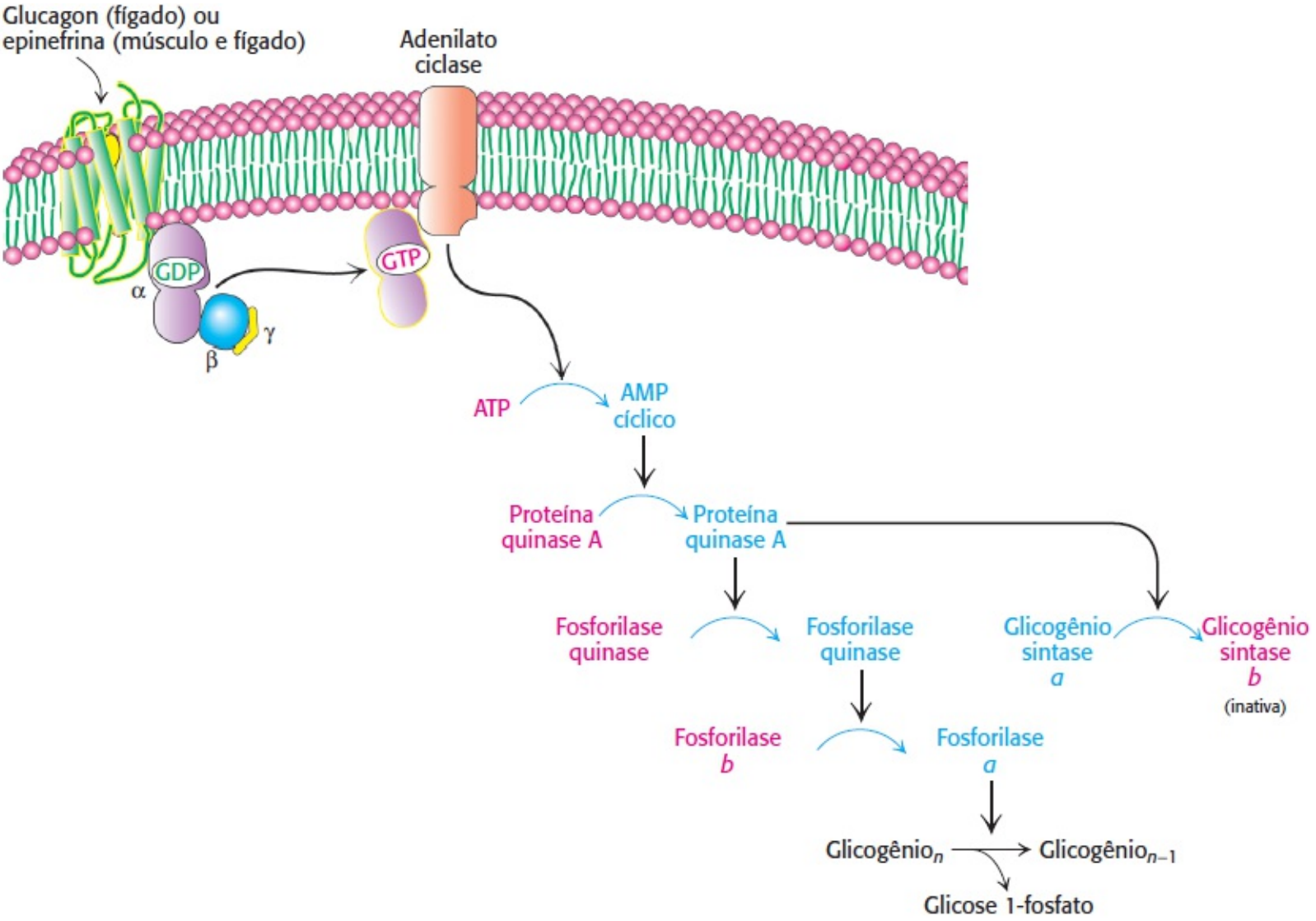


Figura 21.19 Controle coordenado do metabolismo do glicogênio. O metabolismo do glicogênio é regulado, em parte, por cascatas de AMP cíclico desencadeadas por hormônios. A sequência de reações que leva à ativação da proteína quinase A ativa, por fim, a degradação do glicogênio. Ao mesmo tempo, a proteína quinase A também inativa a glicogênio sintase, desligando a síntese de glicogênio.

A proteína fosfatase 1 reverte os efeitos reguladores das quinases sobre o metabolismo do glicogênio

Após uma sessão de exercício, o músculo precisa mudar do modo de degradação de glicogênio para o modo de reposição. A primeira etapa nessa tarefa metabólica consiste em interromper as proteínas fosforiladas que estimulam a degradação do glicogênio. Essa tarefa é realizada por *proteínas fosfatases*, que catalisam a hidrólise de resíduos de serina e treonina fosforiladas em proteínas. *A proteína fosfatase 1 desempenha um papel essencial na regulação do metabolismo do glicogênio* (Figura 21.20). A PP1 inativa a fosforilase *a* e a fosforilase quinase por meio de sua desfosforilação. A PP1 diminui a velocidade de degradação do glicogênio; ela reverte os efeitos da cascata de fosforilação. *Além disso, a PP1 também remove grupos fosforila da glicogênio sintase* b *para convertê-la na forma* a *muito mais ativa.* Aqui, a PP1 também acelera a síntese de glicogênio. A PP1 também constitui outro dispositivo molecular para coordenar o armazenamento de carboidratos.

A subunidade catalítica da PP1 é uma proteína de um único domínio de 37 kDa. Em geral, essa subunidade liga-se a outra de uma família de subunidades regulatórias com massa de aproximadamente 120 kDa; no músculo esquelético e no coração, a subunidade regulatória mais prevalente é denominada G_M, ao passo que, no fígado, a subunidade mais prevalente é G_L. Essas subunidades regulatórias apresentam estruturas modulares com domínios que participam de interações com o glicogênio, com a subunidade catalítica e com enzimas-alvo. Por conseguinte, *essas subunidades regulatórias atuam como andaimes, aproximando a fosfatase de seus substratos no contexto de uma partícula de glicogênio.*

Após uma refeição ou repouso

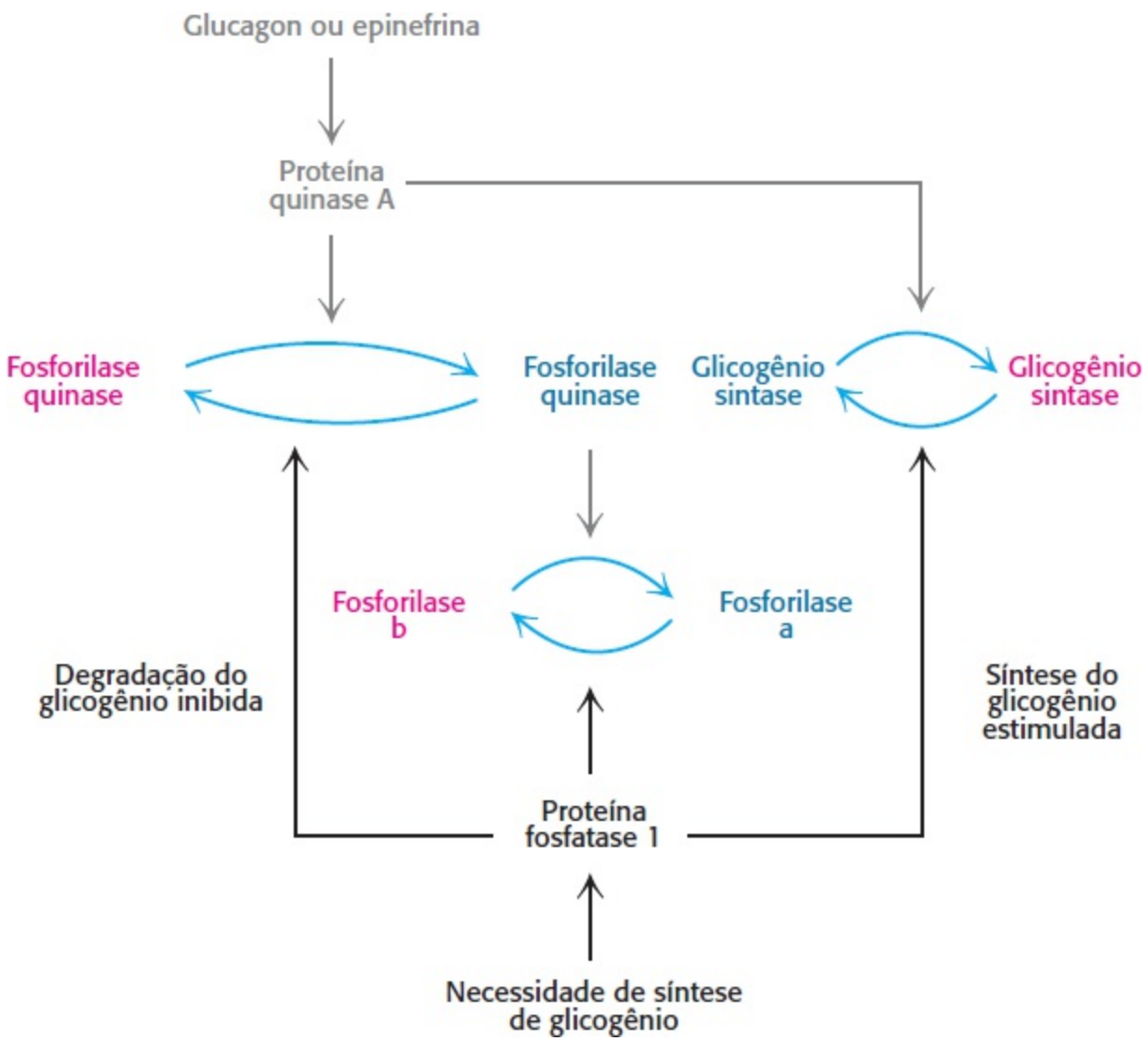


Figura 21.20 regulação da síntese de glicogênio pela proteína fosfatase 1. A proteína fosfatase 1 estimula a síntese de glicogênio, enquanto inibe a sua degradação.

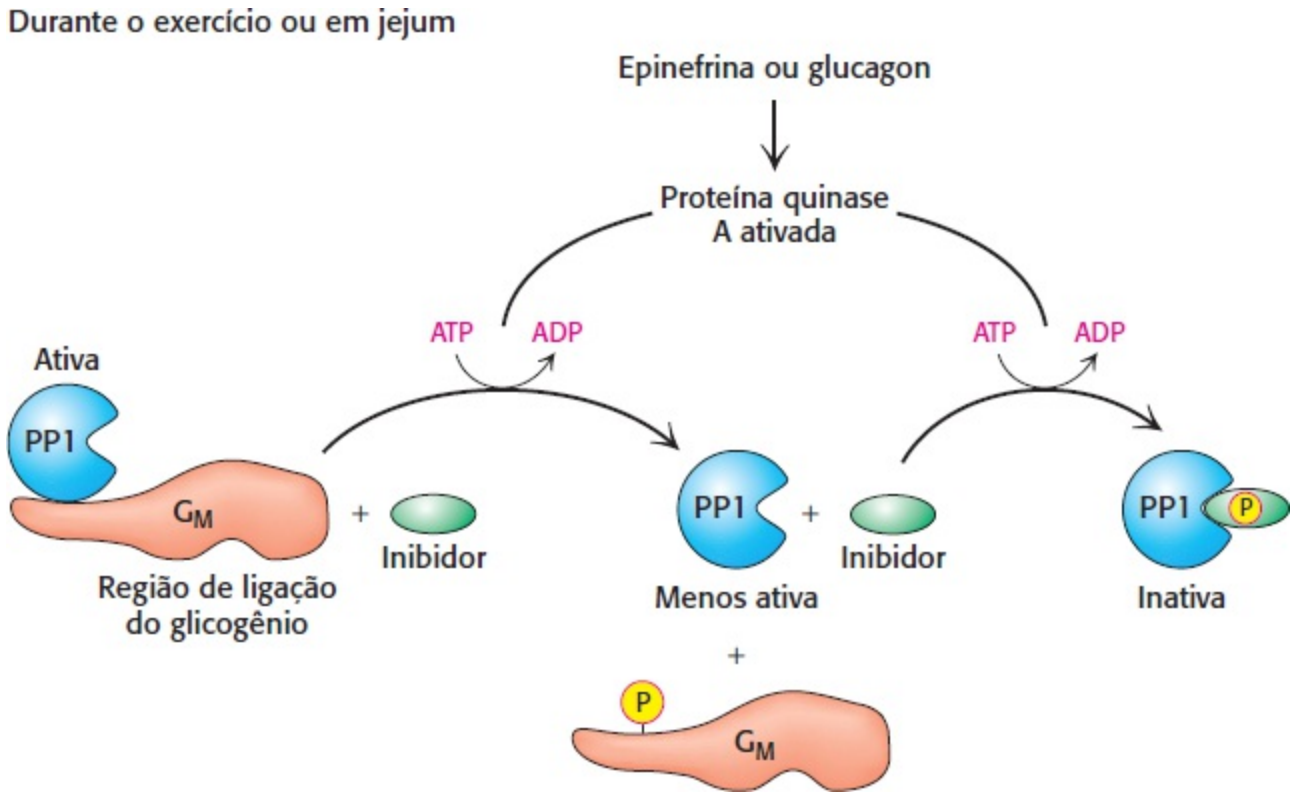


Figura 21.21 A regulação da proteína fosfatase 1 (PP1) no músculo ocorre em duas etapas. A fosforilação da G_M pela proteína quinase A dissocia a subunidade catalítica de seus substratos na partícula de glicogênio. A fosforilação da subunidade inibidora pela proteína quinase A inativa a unidade catalítica da PP1.

A atividade de fosfatase da PP1 precisa ser reduzida quando a degradação de glicogênio é convocada (Figura 21.21). Nesses casos, a epinefrina ou o glucagon ativam a cascata de cAMP, e a proteína quinase A está ativa. A proteína quinase A reduz a atividade da PP1 por dois mecanismos. Em primeiro lugar, no músculo, a G_M é fosforilada no domínio responsável pela ligação da subunidade catalítica. A subunidade catalítica é liberada do glicogênio de seus substratos, e a desfosforilação é acentuadamente reduzida. Em segundo lugar, quase todos os tecidos contêm pequenas proteínas que, quando fosforiladas, ligam-se à subunidade catalítica da PP1, inibindo-a. por conseguinte, quando a degradação do glicogênio é ligada pelo cAMP, a fosforilação concomitante desses inibidores mantém a fosforilase em sua forma *a* ativa e a glicogênio sintase em sua forma *b* inativa.

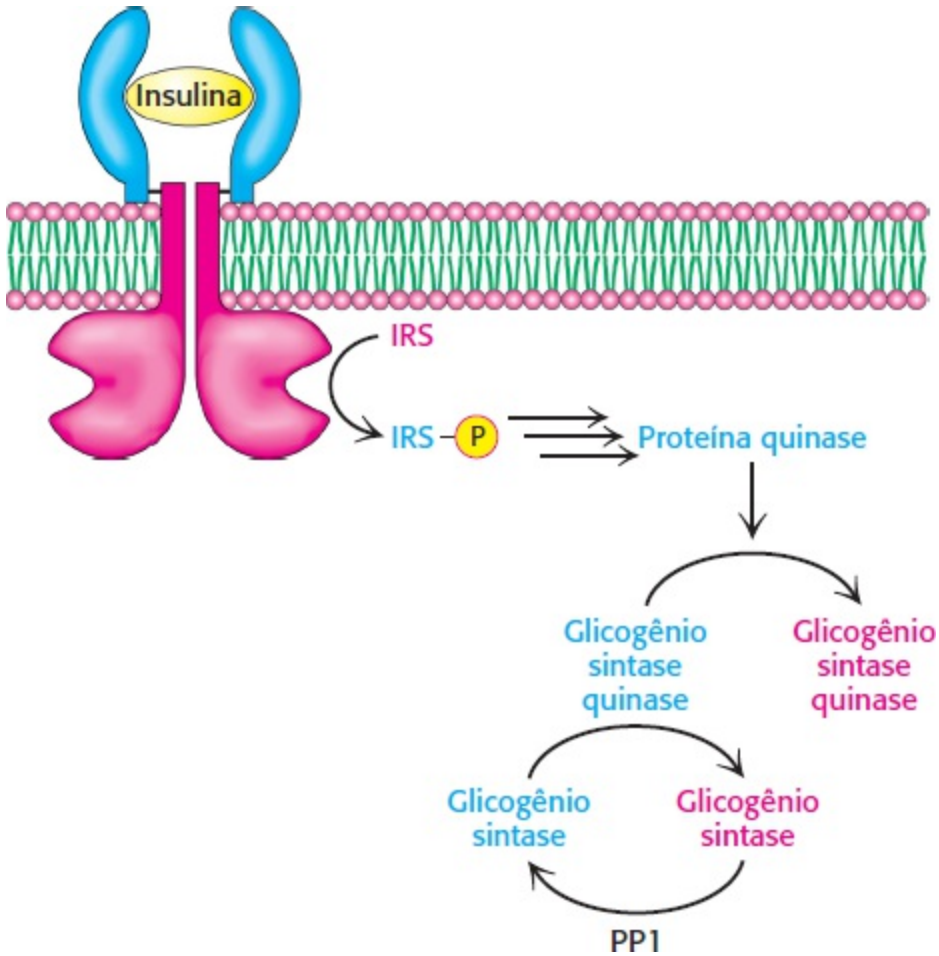


Figura 21.22 A insulina inativa a glicogênio sintase quinase. A insulina desencadeia uma cascata que leva à fosforilação e inativação da glicogênio sintase quinase e impede a fosforilação da glicogênio sintase. A proteína fosfatase 1 (PP1) remove os fosfatos da glicogênio sintase, ativando, assim, a enzima e possibilitando a síntese de glicogênio. IRS, substrato do receptor de insulina.

A insulina estimula a síntese de glicogênio ao ativar a glicogênio sintase quinase

Após o exercício, as pessoas frequentemente consomem alimentos ricos em carboidratos para repor suas reservas de glicogênio. Como a síntese de glicogênio é estimulada? Quando os níveis de glicemia estão elevados, *a insulina estimula a síntese do glicogênio ao inativar a glicogênio*

sintase quinase, a enzima que mantém a glicogênio sintase em seu estado fosforilado inativo (Figura 21.22). A primeira etapa na ação da insulina consiste em sua ligação a um receptor tirosina quinase na membrana plasmática (Seção 14.2). A ligação da insulina ativa a atividade da tirosina quinase do receptor, de modo que ela fosforila substratos do receptor de insulina (IRS, *do inglês insulin receptor substrate*).

Essas proteínas fosforiladas desencadeiam vias de transdução de sinais que finalmente levam à ativação de proteína quinases que fosforilam e inativam a glicogênio sintase quinase. A quinase inativa não pode mais manter a glicogênio sintase em seu estado inativo fosforilado. A proteína fosfatase 1 desfosforila a glicogênio sintase, ativando-a e restaurando as reservas de glicogênio. Convém lembrar que a insulina também induz um aumento da quantidade de glicose na célula ao aumentar o número de transportes de glicose na membrana. Por conseguinte, o efeito final da insulina consiste na reposição das reservas de glicogênio.

O metabolismo do glicogênio no fígado regula o nível de glicemia

Depois de uma refeição rica em carboidratos, ocorre elevação dos níveis de glicemia, e a síntese hepática de glicogênio aumenta. Embora a insulina seja o principal sinal para a síntese de glicogênio, também há a concentração de glicose no sangue, que normalmente varia de cerca de 80 a 120 mg por 100 m*l* (4,4 a 6,7 mM). O fígado é sensível à concentração de glicose no sangue e capta ou libera glicose de acordo com a glicemia. A quantidade de fosforilase *a* do fígado diminui rapidamente quando se infunde glicose (Figura 21.23). Depois de um período de latência, a quantidade de glicogênio sintase *a* aumenta, resultando na síntese de glicogênio. Com efeito, a *fosforilase* a *é o sensor de glicose nas células hepáticas.* A fosforilase *a* e a PP1 estão localizadas na partícula de glicogênio por meio de interações com a subunidade G_L da PP1. A ligação da glicose à fosforilase *a* desloca o equilíbrio alostérico da forma R ativa para a forma T inativa. Essa mudança conformacional faz com que o *grupo fosforila da serina 14 seja um substrato para a proteína fosfatase 1.* A PP1 só se liga firmemente à fosforilase *a* quando esta se encontra no estado R, porém é inativa quando ligada. Quando a glicose induz a transição para a forma T, a PP1 e a fosforilase dissociam-se uma da outra e da partícula de glicogênio, e a PP1 torna-se ativa. É importante lembrar que a transição R → T da fosforilase *a* muscular não é afetada pela glicose e, portanto, não é afetada pela elevação dos níveis de glicemia (Seção 21.2). Esforços estão sendo concentrados para o desenvolvimento de fármacos capazes de desfazer a interação da fosforilase hepática com a subunidade G_L como tratamento para o diabetes melito tipo 2 (Seção 27.2). O diabetes melito tipo 2 caracteriza-se por níveis excessivos de glicemia. Por conseguinte, a ruptura da associação da fosforilase com a G_L a tornaria um substrato da PP1, e a liberação de glicose no sangue seria inibida.

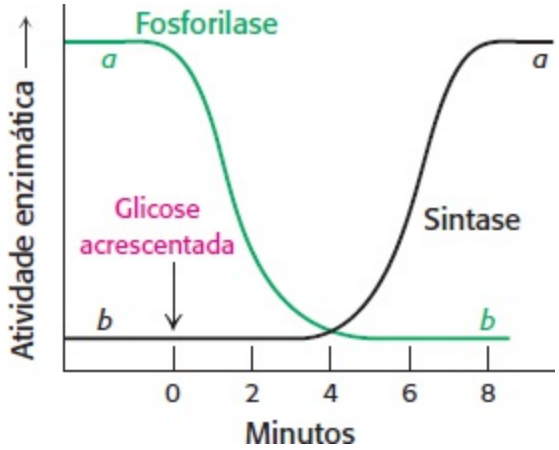


Figura 21.23 A glicemia regula o metabolismo hepático do glicogênio. A infusão de glicose na corrente sanguínea leva à inativação da fosforilase, seguida de ativação da glicogênio sintase no fígado. [De W. Stalmans, H. De Wulf, L. Hue e H-G. Hers. *Eur. J. Biochem*. 41:117-134, 1974.]

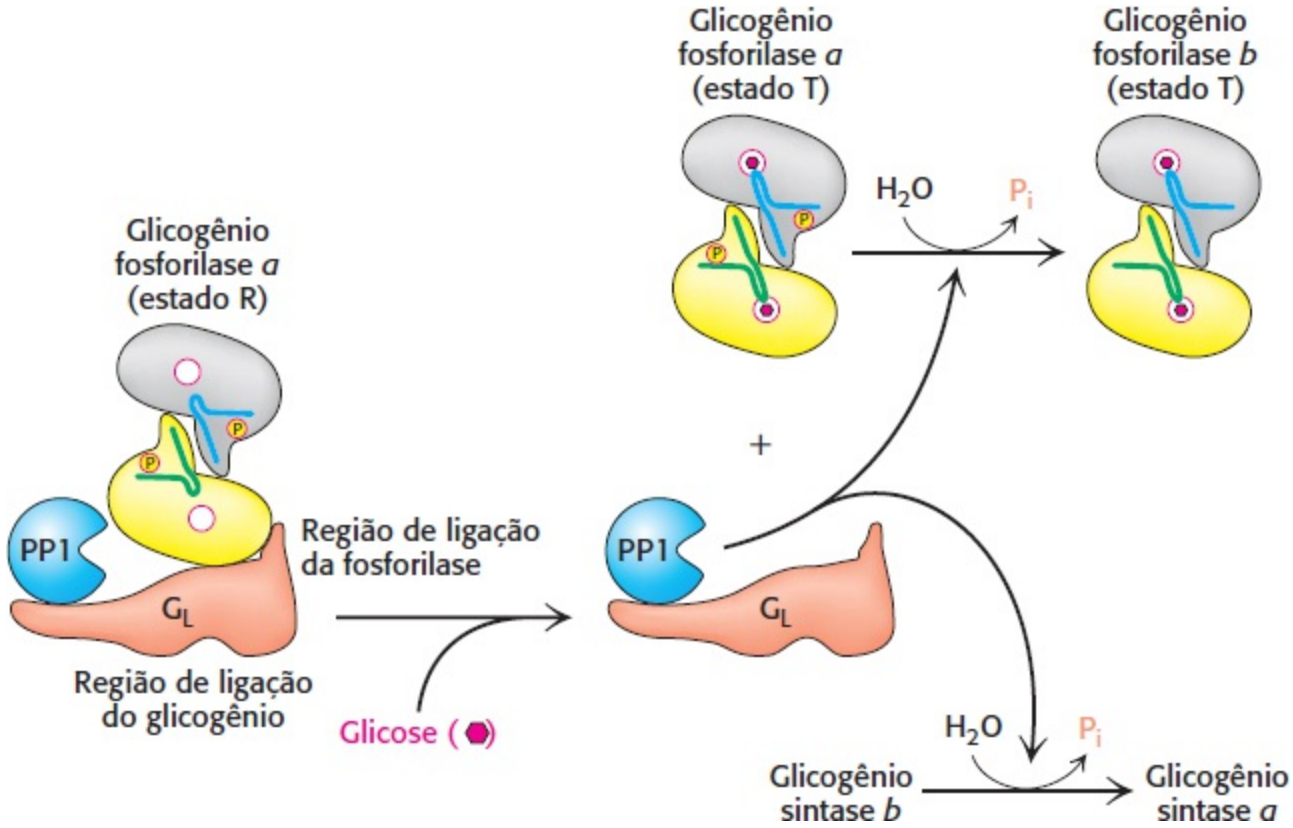


Figura 21.24 Regulação do metabolismo hepático do glicogênio pela glicose. A glicose liga-se à glicogênio fosforilase *a* no fígado e a inibe, facilitando a formação do estado T da fosforilase *a*. O estado T da fosforilase *a* não se liga à proteína fosfatase 1 (PP1), provocando a dissociação e ativação da PP1 da glicogênio fosforilase *a*. A PP1 livre desfosforila a glicogênio fosforilase *a* e a glicogênio sintase *b*, com consequente inativação da degradação do glicogênio e ativação de sua síntese.

Como a glicose ativa a glicogênio sintase? A conversão da forma *a* na forma *b* é acompanhada *da liberação da PP1, que fica então livre para ativar a glicogênio sintase e desfosforilar a glicogênio fosforilase* (Figura 21.24). A remoção do grupo fosforila da glicogênio sintase *b* inativa a converte na forma *a* ativa. Inicialmente, existem cerca de 10 moléculas de fosforilase *a* por molécula de fosfatase. Por conseguinte, *a atividade da glicogênio sintase só começa a aumentar após a conversão de quase toda a fosforilase* a *na forma* b. O intervalo entre a diminuição da degradação de glicogênio e o aumento de sua síntese impede que as duas vias operem simultaneamente. Esse notável sistema sensor de glicose depende de três elementos essenciais: (1) a comunicação entre o

sítio alostérico para a glicose e a serina fosfato, (2) o uso da PP1 para inativar a fosforilase e ativar a glicogênio sintase e (3) a ligação da fosfatase à fosforilase *a* para impedir a ativação prematura da glicogênio sintase.

É possível ter uma compreensão bioquímica das doenças de armazenamento do glicogênio

Edgar von Gierke descreveu a primeira das doenças de armazenamento do glicogênio em 1929. O paciente com essa doença apresenta enorme abdome por causa de um aumento maciço do fígado. Ocorre hipoglicemia pronunciada entre as refeições. Além disso, o nível de glicemia não aumenta com a administração de epinefrina e glucagon. Um lactente com essa doença de armazenamento do glicogênio pode ter convulsões, devido ao baixo nível de glicemia.

O defeito enzimático na doença de von Gierke foi elucidado, em 1952, por Carl e Gerty Cori. Eles descobriram que *a glicose 6-fosfatase estava ausente no fígado de um paciente com essa doença*. Esse achado foi a primeira demonstração de deficiência hereditária de uma enzima hepática. O glicogênio no fígado apresenta estrutura normal, porém está presente em quantidades anormalmente grandes. A ausência de glicose 6-fosfatase no fígado provoca hipoglicemia, visto que a glicose não pode ser formada a partir da glicose 6-fosfato. Esse açúcar fosforilado não deixa o fígado, pois não é capaz de atravessar a membrana plasmática. A presença de glicose 6-fosfato em excesso desencadeia aumento da glicólise hepática, levando a um alto nível de lactato e piruvato no sangue. Os pacientes que apresentam doença de von Gierke também apresentam maior dependência do metabolismo dos lipídios. Essa doença também pode ser produzida por uma mutação no gene que codifica o *transportador de glicose 6-fosfato*. Convém lembrar que a glicose 6-fosfato precisa ser transportada para o lúmen do retículo endoplasmático para ser hidrolisada pela fosfatase. A ocorrência de mutações nas outras três proteínas essenciais desse sistema também pode levar à doença de von Gierke.

Tabela 21.1 Doenças de armazenamento do glicogênio.

Tipo	Enzima deficiente	Órgão afetado	Glicogênio no órgão afetado	Manifestações clínicas
I Von Gierke	Glicose 6-fosfatase ou sistema de transporte	Fígado e rim	Quantidade aumentada; estrutura normal.	Aumento maciço do fígado. Atraso do desenvolvimento. Hipoglicemia grave, cetose, hiperuricemia, hiperlipidemia.
II Pompe	α-1,4-glicosidase (lisossômica)	Todos os órgãos	Aumento maciço da quantidade; estrutura normal.	Insuficiência cardiorrespiratória causando morte, habitualmente antes de 2 anos de idade.
III Cori	Amilo-1,6-glicosidase (enzima desramificadora)	Músculo e fígado	Quantidade aumentada; ramificações externas curtas.	Semelhantes às do tipo I, porém com evolução mais leve.
IV Andersen	Enzima ramificadora (α-1,4 →α-1.6)	Fígado e baço	Quantidade normal; ramificações externas muito longas.	Cirrose hepática progressiva. Insuficiência hepática causando morte, habitualmente antes de 2 anos de idade.
V McArdle	Fosforilase	Músculo	Quantidade moderadamente aumentada; estrutura	Capacidade limitada de realizar exercícios vigorosos, devido a cãibras musculares dolorosas. Nos demais aspectos, o paciente é

			normal.	normal e está bem desenvolvido.
VI Hers	Fosforilase	Fígado	Quantidade aumentada.	Semelhantes às dos tipo I, porém com evolução mais leve.
VII	Fosfofrutoquinase	Músculo	Quantidade aumentada; estrutura normal.	Semelhantes às do tipo V.
VIII	Fosforilase quinase	Fígado	Quantidade aumentada; estrutura normal.	Aumento mais discreto do fígado. Hipoglicemia leve.

Nota: os tipos I a VII são herdados como caráter autossômico recessivo. O tipo VIII é ligado ao sexo.

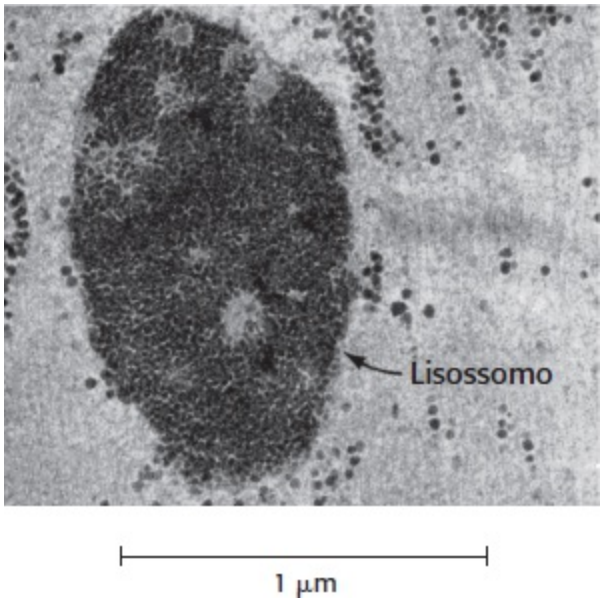


Figura 21.25 Lisossomo ingurgitado de glicogênio. Essa micrografia eletrônica mostra o músculo esquelético de um lactente com doença de armazenamento do glicogênio tipo II (doença de Pompe). Os lisossomos estão repletos de glicogênio, devido a uma deficiência da α-1,4-glicosidase, uma enzima hidrolítica restrita aos lisossomos. A quantidade do glicogênio no citoplasma está normal. [De H-G. Hers e F. Van Hoof, Eds., *Lysosomes and Storage Diseases* (Academic Press, 1973), p. 205.]

Sete outras doenças de armazenamento do glicogênio foram caracterizadas (Tabela 21.1). Na doença de Pompe (tipo II), os lisossomos ficam ingurgitados de glicogênio, devido à deficiência da α-1,4-glicosidase, uma enzima hidrolítica restrita a essas organelas (Figura 21.25). Carl e Gerty Cori também elucidaram o defeito bioquímico de outra doença de armazenamento do glicogênio (tipo III), que não pode ser diferenciada de von Gierke (tipo I) baseando-se apenas no exame físico. Na doença tipo III, a estrutura do glicogênio hepático e muscular é anormal, e a sua quantidade está acentuadamente aumentada. Ainda mais notável, as ramificações externas do glicogênio são muito curtas. *Os pacientes que apresentam esse tipo carecem da enzima desramificadora (α-1,6-glicosidase)*, e, portanto, apenas as ramificações mais externas do glicogênio podem ser usadas de modo efetivo. Por conseguinte, apenas uma pequena fração desse glicogênio anormal é funcionalmente ativa como reserva acessível de glicose.

Um defeito no metabolismo do glicogênio restrito ao músculo é encontrado na doença de McArdle (tipo V). A *atividade da fosforilase muscular está ausente*, e a capacidade do paciente de executar exercício intenso é limitada devido à ocorrência de cãibras musculares dolorosas. Nos demais aspectos, o paciente é normal e bem desenvolvido. Por conseguinte, a utilização efetiva do

glicogênio muscular não é essencial à vida. Estudos de ressonância magnética nuclear (RM) com fósforo 31 nesses pacientes têm sido muito informativos. O pH das células do músculo esquelético de indivíduos normais cai durante o exercício intenso, devido à produção de lactato. Em contrapartida, as células musculares de pacientes com doença de McArdle tornam-se mais alcalinas durante o exercício, devido à degradação da creatina fosfato (Seção 15.2). Não há acúmulo de lactato nesses pacientes, visto que a velocidade de glicólise de seus músculos é muito menor do que o normal; o glicogênio não pode ser mobilizado. Os estudos de RM também demonstraram que as cãibras dolorosas nessa doença estão relacionadas com níveis elevados de ADP (Figura 21.26). A espectroscopia de RM é uma técnica não invasiva valiosa para avaliar a terapia dietética e fisioterapia para essa doença.

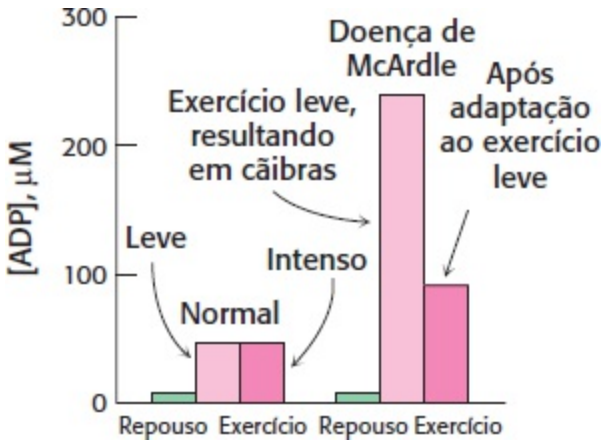


Figura 21.26 Estudo de RM de músculo do braço humano. O nível de ADP durante o exercício aumenta muito mais em pacientes com doença de armazenamento do glicogênio de McArdle (tipo V) do que em controles normais. [De G. K. Radda. *Biochem. Soc. Trans*. 14:517-525, 1986.]

Resumo

O glicogênio, uma reserva energética prontamente mobilizada, é um polímero ramificado de resíduos de glicose. As unidades de glicose no glicogênio estão ligadas, em sua maioria, por ligações glicosídicas α-1,4. A cerca de cada dez resíduos, surge uma ramificação por meio de uma ligação glicosídica α-1,6. O glicogênio está presente em grandes quantidades nas células musculares e nas células hepáticas, onde é armazenado no citoplasma, na forma de grânulos hidratados.

21.1 A degradação do glicogênio requer a interação de várias enzimas

A maior parte da molécula de glicogênio é degradada a glicose 1-fosfato pela ação da glicogênio fosforilase, a enzima-chave na degradação do glicogênio. A ligação glicosídica entre o C-1 de um resíduo terminal e o C-4 do resíduo adjacente é clivada por ortofosfato, produzindo glicose 1-fosfato, que pode ser convertida reversivelmente em glicose 6-fosfato. Os pontos de ramificação são degradados pela ação combinada de uma oligossacarídio transferase e uma α-1,6-glicosidase.

21.2 A fosforilase é regulada por interações alostéricas e por fosforilação reversível

A fosforilase *b*, que é habitualmente inativa, é convertida em fosforilase *a* ativa pela

fosforilação de um único resíduo de serina em cada subunidade. Essa reação é catalisada pela fosforilase quinase. A forma *b* no músculo também pode ser ativada pela ligação do AMP, um efeito antagonizado pelo ATP e pela glicose 6-fosfato. A forma *a* no fígado é inibida pela glicose. Os sítios de ligação do AMP e os de fosforilação estão localizados na interface das subunidades. No músculo, a fosforilase é ativada, produzindo glicose para uso dentro da célula como fonte de energia para a atividade contrátil. Em contrapartida, a fosforilase hepática é ativada para liberar glicose, que é exportada para outros órgãos, como o músculo esquelético e o cérebro.

21.3 A epinefrina o glucagon sinalizam a necessidade de degradação do glicogênio

A epinefrina e o glucagon estimulam a degradação de glicogênio por meio de receptores 7TM específicos. O músculo constitui o principal alvo da epinefrina, enquanto o fígado responde ao glucagon. Ambas as moléculas de sinalização iniciam uma cascata de quinases que leva à ativação da glicogênio fosforilase.

21.4 O glicogênio é sintetizado e degradado por vias diferentes

A via para a síntese do glicogênio difere daquela para a sua degradação. A UDP-glicose, o intermediário ativado na síntese de glicogênio, é formado a partir da glicose 1-fosfato e UTP. A glicogênio sintase catalisa a transferência de glicose da UDP-glicose para o grupo hidroxila em C-4 de um resíduo terminal na molécula de glicogênio em crescimento. A síntese é iniciada pela glicogenina, uma proteína autoglicosilante, que contém uma unidade de oligossacarídio covalentemente ligado a um resíduo específico de tirosina. Uma enzima ramificadora converte parte das ligações α-1,4 em ligações α-1,6 para aumentar a quantidade de extremidades, de modo que o glicogênio possa ser sintetizado e degradado mais rapidamente.

21.5 A degradação e a síntese de glicogênio são reguladas de modo recíproco

A síntese e a degradação do glicogênio são coordenadas por várias cascatas de reações amplificadoras. A epinefrina e o glucagon estimulam a degradação do glicogênio e inibem a sua síntese, aumentando o nível citoplasmático de AMP cíclico, que ativa a proteína quinase A. A proteína quinase A ativa a degradação do glicogênio ao fixar um fosfato à fosforilase quinase e inibe a síntese de glicogênio ao fosforilar a glicogênio sintase.

As ações de mobilização de glicogênio da proteína quinase A são revertidas pela proteína fosfatase 1, que é regulada por vários hormônios. A epinefrina inibe essa fosfatase ao bloquear sua fixação às moléculas de glicogênio e ao ativar um inibidor. Em contrapartida, a insulina desencadeia uma cascata que fosforila e inativa a glicogênio sintase quinase, uma das enzimas que inibe a glicogênio sintase. Por conseguinte, a síntese de glicogênio é diminuída pela epinefrina e aumentada pela insulina. A glicogênio sintase e a fosforilase também são reguladas por interações alostéricas não covalentes. Com efeito, a fosforilase é um elemento-chave no sistema sensor de glicose das células hepáticas. O metabolismo do glicogênio exemplifica o poder e a precisão da fosforilação reversível na regulação dos processos biológicos.

Palavras-chave

calmodulina (p. 628)
epinefrina (adrenalina) (p. 628)
fosforilase quinase (p. 627)
fosforólise (p. 621)
glicogenina (p. 632)
glicogênio fosforilase (p. 621)
glicogênio sintase (p. 632)
glucagon (p. 628)
insulina (p. 636)
piridoxal fosfato (PLP) (p. 623)
proteína fosfatase 1 (PP1) (p. 635)
proteína quinase A (PKA) (p. 630)
uridina difosfato glicose (UDP-glicose) (p. 631)

Questões

1. *A escolha é boa.* O glicogênio não é tão reduzido quanto os ácidos graxos e, por isso, não é tão rico em energia. Por que os animais armazenam energia na forma de glicogênio? Por que eles não convertem todo o excesso de combustível em ácidos graxos?

2. Se pouco é bom, muito é melhor. A α-amilose é um polímero não ramificado de glicose. Por que esse polímero não deve ser tão eficiente quanto o glicogênio como forma de armazenamento da glicose?

3. *Produtos reveladores*. Uma amostra de glicogênio de um paciente com doença hepática é incubada com ortofosfato, fosforilase, a transferase e a enzima desramificadora (α-1,6-glicosidase). A razão entre glicose 1- fosfato e glicose formada nessa mistura é de 100. Qual é a deficiência enzimática mais provável nesse paciente?

4. *Ousando ser diferente*. Compare a regulação alostérica da fosforilase no fígado e no músculo e explique a importância da diferença.

5. *Uma influência no equilíbrio*. A reação catalisada pela fosforilase é prontamente reversível *in vitro*. Em pH de 6,8, a razão de equilíbrio entre ortofosfato e glicose 1-fosfato é de 3,6. O valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ para essa reação é pequeno, visto que uma ligação glicosídica é substituída por uma ligação fosforil éster, que tem um potencial de transferência quase igual. Entretanto, a fosforólise prossegue na direção da degradação de glicogênio *in vivo*. Proponha um meio pelo qual a reação possa se tornar irreversível *in vivo*.

6. *Armazenamento excessivo*. Sugira uma explicação para o fato de a quantidade de glicogênio na doença de armazenamento do glicogênio tipo I (doença de von Gierke) estar aumentada.

7. *Recuperando uma fosforila essencial*. O grupo fosforila da fosfoglicomutase é lentamente perdido por hidrólise. Proponha um mecanismo que utilize um intermediário catalítico conhecido para restaurar esse grupo fosforila essencial. Como esse doador de fosforila poderia ser formado?

8. *Nem todas as ausências são iguais*. A doença de Hers resulta da ausência de glicogênio fosforilase hepática e pode ser grave. Na doença de McArdle, a glicogênio fosforilase muscular está

ausente. Embora a realização de exercício seja difícil para pacientes portadores de doença de McArdle, esta doença raramente representa uma ameaça à vida. Explique as manifestações diferentes da ausência de glicogênio fosforilase nos dois tecidos. O que a existência dessas duas doenças diferentes indica sobre a natureza genética da fosforilase?

9. *Hidrofobia*. Por que a água é excluída do sítio ativo da fosforilase? Qual é o efeito previsto de uma mutação que possibilite a entrada de moléculas de água?

10. *Removendo todos os vestígios*. Em extratos de fígado humano, a atividade catalítica da glicogenina só foi detectada após tratamento com α-amilase (p. 633). Por que a α-amilase foi necessária para revelar a atividade da glicogenina?

11. *Duas em uma*. Uma única cadeia polipeptídica abriga a transferase e a enzima desramificadora. Cite uma vantagem potencial desse arranjo.

12. *Como eles fizeram isso?* Foi desenvolvida uma cepa de camundongos que carecem da enzima fosforilase quinase. Contudo, mesmo após exercício intenso, ocorre depleção das reservas de glicogênio de um camundongo dessa cepa. Explique como essa depleção é possível.

13. *Um inibidor apropriado*. Qual a justificativa para a inibição da glicogênio fosforilase muscular pela glicose 6-fosfato, quando a glicose 1-fosfato é o produto da reação da fosforilase?

14. *Passando a informação.* Faça um resumo da cascata de transdução de sinais para a degradação do glicogênio no músculo.

15. *Nos freios.* Deve haver um meio de interromper rapidamente a degradação do glicogênio para impedir o desperdício decorrente da depleção de glicogênio uma vez supridas as necessidades energéticas. Que mecanismos são empregados para interromper a degradação do glicogênio?

16. *Diametralmente opostos.* A fosforilação tem efeitos opostos sobre a síntese e a degradação do glicogênio. Qual a vantagem desses efeitos opostos?

17. *Sentindo-se exaurido.* A depleção de glicogênio que resulta do exercício intenso e extenso pode levar à exaustão e incapacidade de continuar uma atividade física. Algumas pessoas também sentem tontura, incapacidade de concentração e perda do controle muscular. Explique esses sintomas.

18. *Todo mundo tem um trabalho a fazer*. O que explica o fato de a fosforilase hepática ser um sensor de glicose, o que não ocorre com a fosforilase muscular?

19. *Se você insistir*. Por que a ativação da forma *b* fosforilada da glicogênio sintase por altas concentrações de glicose 6-fosfato faz sentido em termos químicos?

20. *Um ATP economizado é um ATP ganho*. A oxidação completa da glicose 6-fosfato derivada da glicose livre produz 30 moléculas de ATP, enquanto a oxidação completa da glicose 6-fosfato derivada do glicogênio produz 31 moléculas de ATP. Explique essa diferença.

21. *Papéis duplos*. A fosfoglicomutase é crucial para a degradação, bem como para a síntese de glicogênio. Explique o papel dessa enzima em cada um dos dois processos.

22. *Trabalhando com contradições*. Escreva uma equação balanceada mostrando o efeito da ativação simultânea da glicogênio fosforilase e da glicogênio sintase. Inclua as reações catalisadas

pela fosfoglicomutase e pela UDP-glicose pirofosforilase.

23. *Alcançando a imortalidade*. A glicogênio sintase necessita de um iniciador (*primer*). Antigamente, acreditava-se que o iniciador fosse fornecido quando os grânulos de glicogênio existentes eram divididos entre as células-filhas produzidas por divisão celular. Em outras palavras, partes da molécula original de glicogênio eram simplesmente passadas de uma geração para outra. Essa estratégia teria tido sucesso na transmissão das reservas de glicogênio de uma geração a outra? Hoje em dia, o que se sabe sobre a síntese de novas moléculas de glicogênio?

24. *Sinal de síntese.* Como a insulina estimula a síntese de glicogênio?

Questão sobre mecanismo

25. *Semelhança de família*. Proponha mecanismos para as duas enzimas que catalisam as etapas na desramificação do glicogênio, com base no fato de elas serem potencialmente membros da família da α-amilase.

Questãoes | Integração de capítulos

26. *Conversão de carboidratos*. Escreva uma equação balanceada para a formação de glicogênio a partir da galactose.

27. *Trabalhando em conjunto*. Quais são as enzimas necessárias para a liberação da glicose hepática no sangue quando um organismo está dormindo e em jejum?

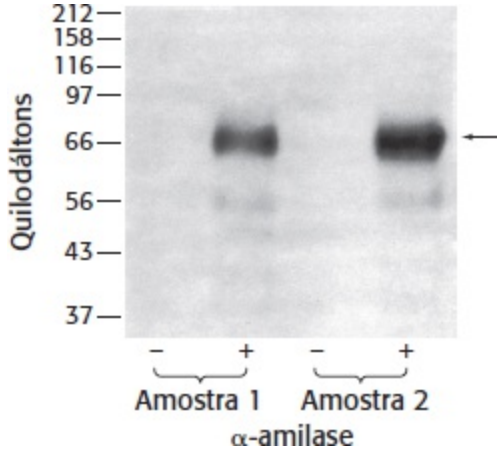
28. *Experimento de quebra*. Cristais de fosforilase *a* que crescem na presença de glicose se desfazem quando se acrescenta um substrato como a glicose 1-fosfato. Por quê?

29. *Esse rosto não me é estranho*. A UDP-glicose é a forma ativada da glicose usada na síntese de glicogênio. Entretanto, já encontramos anteriormente outras formas ativadas semelhantes de carboidratos em nosso estudo do metabolismo. Onde já vimos UDP-carboidratos?

30. *Mesmos sintomas, causas diferentes*. Sugira outra mutação no metabolismo da glicose capaz de causar sintomas semelhantes aos da doença de von Gierke.

Questões | Interpretação de dados

31. *Isolamento do glicogênio 1*. O fígado é o principal local de armazenamento de glicogênio. Purificado a partir de duas amostras de fígado humano, o glicogênio foi tratado ou não tratado com α-amilase e, subsequentemente, analisado por SDS-PAGE e *Western blotting* com o uso de anticorpos dirigidos contra a glicogenina. Os resultados são apresentados na ilustração seguinte.



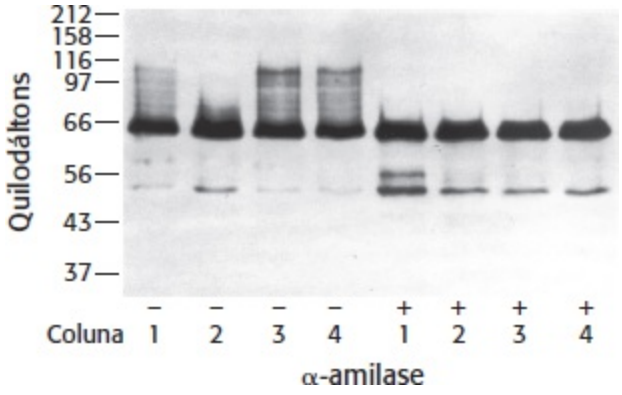
Isolamento do glicogênio 1. [Cortesia do Dr. Peter J. Roach, Indiana University School of Medicine.]

(a) Por que não há proteínas visíveis nas colunas sem tratamento com amilase?

(b) Qual é o efeito do tratamento das amostras com a α-amilase? Explique os resultados.

(c) Liste outras proteínas que você poderia esperar que estivessem associadas ao glicogênio. Por que outras proteínas não são visíveis?

32. *Isolamento do glicogênio 2*. O gene para a glicogenina foi transfectado para uma linhagem de células que normalmente armazena apenas pequenas quantidades de glicogênio. As células foram então manipuladas de acordo com o seguinte protocolo, e o glicogênio foi isolado e analisado por SDS-PAGE e *Western blotting*, usando um anticorpo dirigido contra a glicogenina, com e sem tratamento com α-amilase. Os resultados são apresentados na ilustração seguinte



Isolamento do glicogênio 2. [Cortesia do Dr. Peter J. Roach, Indiana University School of Medicine.]

O protocolo: células cultivadas em meio de crescimento e com 25 mM de glicose (coluna 1) foram transferidas para um meio sem glicose por 24 h (coluna 2). As células privadas de glicose foram novamente colocadas em meio contendo 25 mM de glicose por 1 h (coluna 3) ou 3 h (coluna 4). As amostras (12 μg de proteína) foram tratadas ou não tratadas com α-amilase, conforme indicado, antes de sua aplicação no gel.

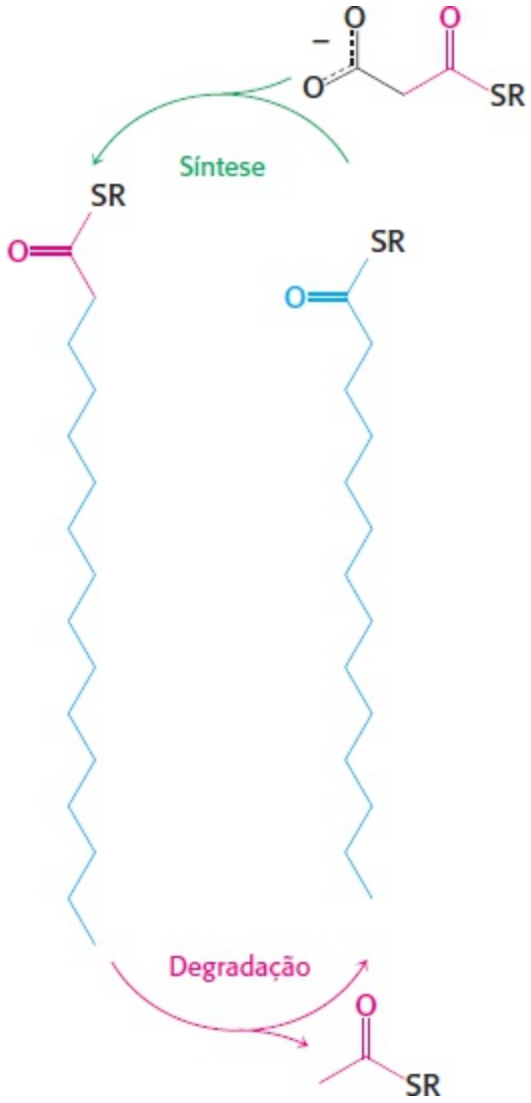
(a) Por que a análise por *Western* produz um "esfregaço" – isto é, a coloração de alto peso molecular na coluna 1(–)?

(b) Qual o significado da diminuição na coloração de alto peso molecular na coluna 2(–)?

(c) Qual o significado da diferença entre as colunas 2(–) e 3(–)?

(d) Forneça uma razão plausível pela qual não há essencialmente nenhuma diferença entre as colunas 3(–) e 4(–)?

(e) Por que as bandas em 66 kDa são as mesmas nas colunas tratadas com amilase, apesar de as células terem sido tratadas diferentemente?



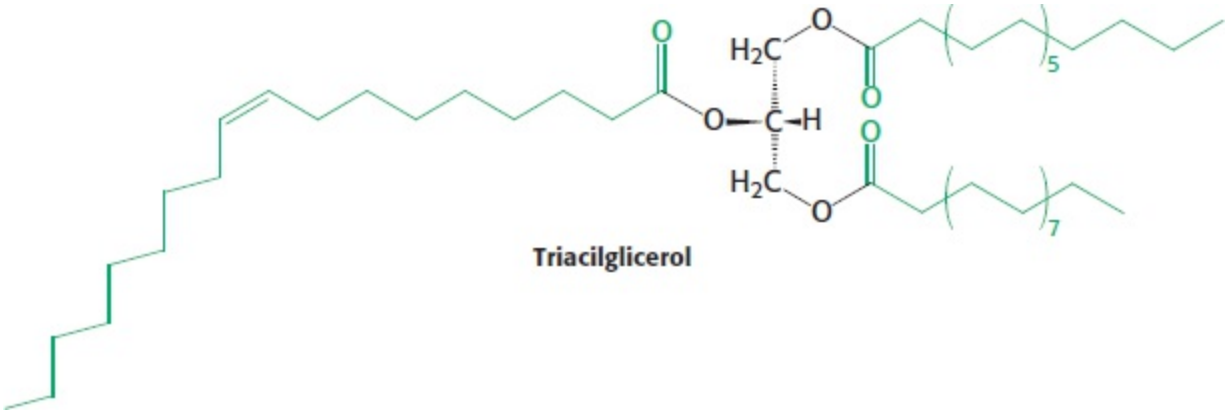
As gorduras fornecem um meio eficiente para o armazenamento de energia para uso posterior. (À direita) Os processos de síntese de ácidos graxos (preparação para o armazenamento de energia) e sua degradação (preparação para o uso de energia) são, em muitos aspectos, inversos. (Acima) Estudos com camundongos revelam a inter-relação dessas vias e as bases bioquímicas do apetite e do controle do peso. [Fotografia © Jackson/Visuals Unlimited.]

SUMÁRIO

22.1 Os triacilgliceróis são reservas de energia altamente concentradas
22.2 A utilização de ácidos graxos como fonte de energia requer três estágios de processamento
22.3 Os ácidos graxos insaturados e de cadeia ímpar exigem etapas adicionais para a sua degradação
22.4 Os ácidos graxos são sintetizados pela ácido graxo sintase
22.5 O alongamento e a insaturação de ácidos graxos são efetuados por sistemas enzimáticos acessórios
22.6 A acetil-CoA carboxilase desempenha um papel essencial no controle do metabolismo dos ácidos graxos

Passemos agora do metabolismo dos carboidratos para o dos ácidos graxos. Um ácido graxo contém uma cadeia longa de hidrocarboneto e um grupo carboxila terminal. Os ácidos graxos desempenham quatro funções fisiológicas principais. Em primeiro lugar, *os ácidos graxos são* fontes de energia. São armazenados como *triacilgliceróis* (também denominados *gorduras neutras* ou *triglicerídios*), que são ésteres de ácidos graxos sem carga com glicerol. Os triacilgliceróis são

armazenados no tecido adiposo, que é constituído por células denominadas adipócitos (Figura 22.1). Os ácidos graxos mobilizados a partir dos triacilgliceróis são oxidados para suprir as necessidades de energia de uma célula ou de um organismo. Durante o repouso ou o exercício moderado, como caminhada, os ácidos graxos constituem a nossa principal fonte de energia. Em segundo lugar, os *ácidos graxos são as unidades básicas de construção dos fosfolipídios e glicolipídios.* Essas moléculas anfipáticas são importantes componentes das membranas biológicas, conforme discutido no Capítulo 12. Em terceiro lugar, muitas proteínas são modificadas pela *ligação covalente de ácidos graxos, que as direcionam para locais da membrana.* Por fim, *derivados de ácidos graxos atuam como hormônios e mensageiros intracelulares.* Neste capítulo, abordaremos a oxidação e a síntese de ácidos graxos.



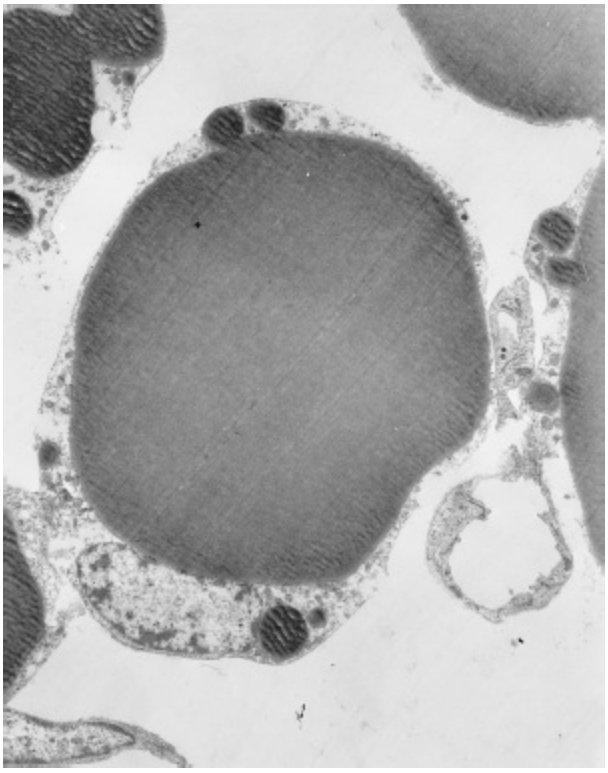


Figura 22.1 Micrografia eletrônica de um adipócito. Uma pequena faixa do citoplasma circunda o grande depósito de triacilgliceróis. [Biophoto Associates/Photo Researchers.]

A degradação e a síntese de ácidos graxos espelham-se em suas reações químicas

A degradação e a síntese de ácidos graxos consistem em quatro etapas, que são inversas na sua química básica. A degradação é um processo oxidativo, que converte ácido graxo em um conjunto de

unidades acetila ativadas (acetil-CoA), que podem ser processadas pelo ciclo do ácido cítrico (Figura 22.2). Um ácido graxo ativado é oxidado para introduzir uma dupla ligação; essa dupla ligação é hidratada para introduzir um grupo hidroxila; o álcool é oxidado a uma acetona e, por fim, o ácido graxo é clivado pela coenzima A, produzindo acetil-CoA e uma cadeia de ácido graxo com dois carbonos a menos. Se o ácido graxo tiver um número par de átomos de carbono e for saturado, o processo simplesmente se repetirá até que o ácido graxo seja totalmente convertido em unidades de acetil-CoA.

A síntese de ácidos graxos é essencialmente o inverso desse processo. O processo começa com unidades individuais para montagem – nesse caso, com um grupo acila ativado (mais simplesmente, uma unidade acetila) e uma unidade malonila (Figura 22.2). A unidade malonila condensa-se com a unidade acetila, formando um fragmento de quatro carbonos. Para produzir a cadeia de hidrocarboneto necessária, o grupo carbonila é reduzido a um grupo metileno em três etapas: uma redução, uma desidratação e outra redução, exatamente o oposto da degradação. O produto da redução é butiril-CoA. Outro grupo malonila ativado condensa-se com a unidade butirila, e o processo se repete até que seja sintetizado um ácido graxo C_{16} ou mais curto.

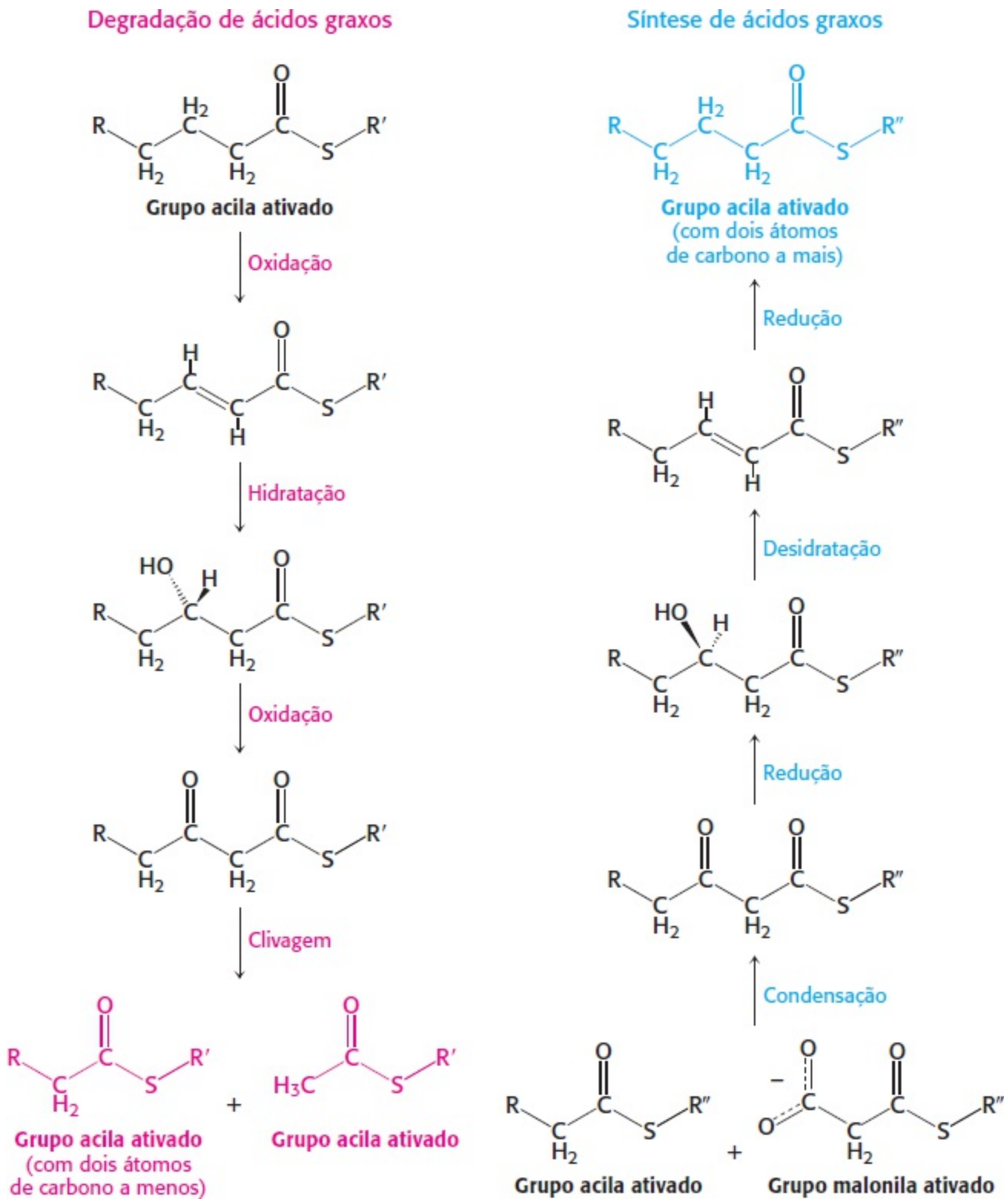


Figura 22.2 Etapas na degradação e na síntese de ácidos graxos. Os dois processos são, em muitos aspectos, imagens especulares um do outro.

22.1 Os triacilgliceróis são reservas de energia altamente concentradas

Os triacilgliceróis são reservas altamente concentradas de energia metabólica, visto que são reduzidos e *anidros*. O rendimento da oxidação completa dos ácidos graxos é de cerca de 38 kJ g^{-1} (9 kcal g^{-1}), em contraste com cerca de 17 kJ g^{-1} (4 kcal g^{-1}) dos carboidratos e das proteínas. A base dessa grande diferença de rendimento calórico é que os ácidos graxos são muito mais reduzidos do que os carboidratos ou as proteínas. Além disso, os triacilgliceróis são apolares e, portanto, são

armazenados em uma forma quase anidra, enquanto os carboidratos muito mais polares são mais hidratados. Com efeito, 1 g de glicogênio seco liga-se a cerca de 2 g de água. Em consequência, *um grama de reservas de gorduras quase anidras armazena 6,75 vezes mais energia do que um grama de glicogênio hidratado,* provavelmente o motivo pelo qual os triacilgliceróis, e não o glicogênio, foram selecionados na evolução como principal reservatório de energia. Consideremos um homem típico de 70 kg, com reservas energéticas de 420.000 kJ (100.000 kcal) em triacilgliceróis, 100.000 kJ (24.000 kcal) em proteínas (principalmente no músculo), 2.500 kJ (600 kcal) em glicogênio e 170 kJ (40 kcal) em glicose. Os triacilgliceróis constituem cerca de 11 kg de seu peso corporal total. Se essa quantidade de energia fosse armazenada na forma de glicogênio, o seu peso corporal total seria 64 kg maior. As reservas de glicogênio e de glicose fornecem energia suficiente para sustentar as funções fisiológicas por cerca de 24 h, enquanto as reservas de triacilgliceróis possibilitam uma sobrevida por várias semanas.

Nos mamíferos, o principal local de acúmulo dos triacilgliceróis é o citoplasma das *células adiposas* (*células de gordura*). Esse tecido rico em energia encontra-se distribuído por todo corpo, notavelmente sob a pele (gordura subcutânea) e circundando os órgãos internos (gordura visceral). As gotículas de triacilglicerol coalescem formando um grande glóbulo, denominado gotícula de lipídio, que pode ocupar a maior parte do volume da célula (Figura 22.1). A gotícula de lipídio é circundada por uma única camada de fosfolipídios e proteínas necessários para o metabolismo dos triacilgliceróis. As células adiposas são especializadas para a síntese e o armazenamento de triacilgliceróis e para sua mobilização em moléculas fornecedoras de energia, que são transportadas pelo sangue para outros tecidos. O músculo também armazena triacilgliceróis para suas próprias necessidades energéticas. Com efeito, os triacilgliceróis são evidentes pela aparência marmoreada.

A utilidade dos triacilgliceróis como fonte de energia é notavelmente ilustrada pela capacidade das aves migratórias, que podem voar por grandes distâncias sem se alimentar, após ter armazenado energia na forma de triacilgliceróis. Exemplos são a tarambola-dourada e o beija-flor-de-papo-vermelho. A tarambola-dourada pode voar do Alasca até o extremo sul da América do Sul; grande parte do voo (3.800 km ou 2.400 milhas) ocorre sobre o oceano, onde as aves não podem se alimentar. O beija-flor-de-papo-vermelho pode voar ininterruptamente pelo Golfo do México. Os ácidos graxos fornecem a fonte de energia para ambas essas façanhas prodigiosas.

Os triacilgliceróis abastecem os longos voos de migração da tarambola-dourada *(Pluvialis dominica).* [Gerard Fuehrer\Visuals Unlimited.]

Os lipídios alimentares são digeridos por lipases pancreáticas

Os lipídios são ingeridos, em sua maioria, na forma de triacilgliceróis e precisam ser degradados a ácidos graxos para sua absorção através do epitélio intestinal. Enzimas intestinais, denominadas *lipases*, que são secretadas pelo pâncreas, degradam os triacilgliceróis a ácidos graxos livres e monoacilglicerol (Figura 22.3). Os lipídios apresentam um problema especial, visto que, diferentemente dos carboidratos e das proteínas, essas moléculas não são solúveis em água. Como então elas se tornam acessíveis às lipases, que estão em solução aquosa? A solução consiste em envolver os lipídios em um invólucro solúvel. Os triacilgliceróis no lúmen intestinal são incorporados em micelas compostas de *sais biliares* (Figura 22.4), que são moléculas anfipáticas sintetizadas a partir do colesterol no fígado e secretadas pela vesícula biliar. A ligação éster de cada lipídio está orientada para a superfície da micela, tornando-a mais suscetível à digestão pelas lipases em solução aquosa. Os produtos finais da digestão são transportados em micelas até o epitélio intestinal, onde são transportados através da membrana plasmática (Figura 22.5). Se a produção de sais biliares for inadequada devido à presença de doença hepática, ocorrerá excreção de grandes quantidades de gorduras (até 30 g dia^{-1}) nas fezes. Essa condição é designada como *esteatorreia*, termo derivado do ácido esteárico, um ácido graxo comum.

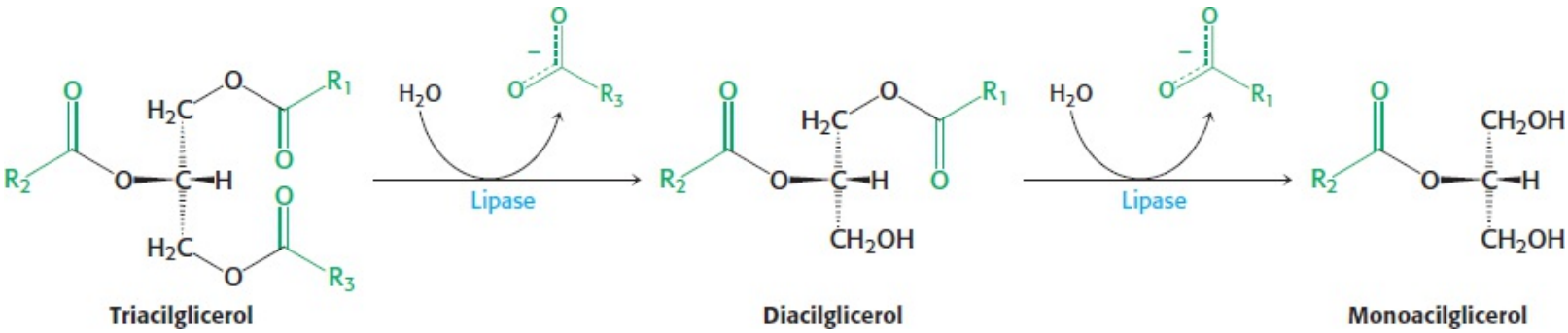
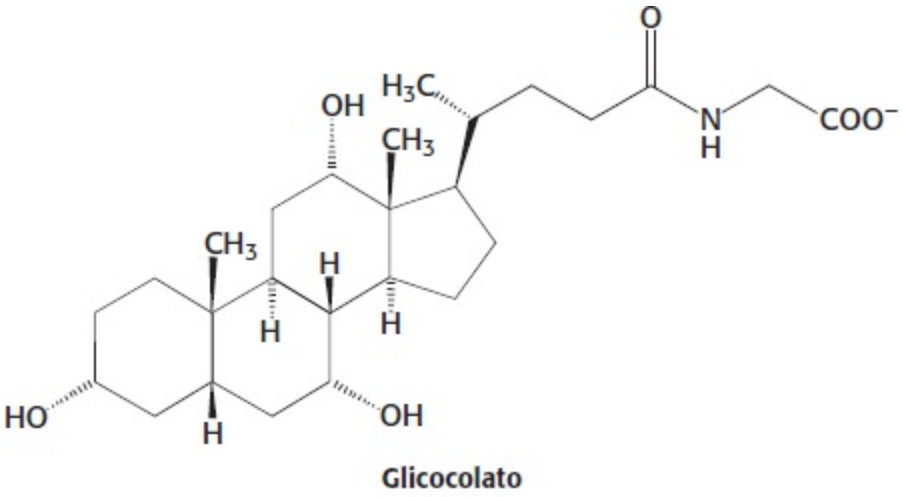


Figura 22.3 Ação das lipases pancreáticas. As lipases secretadas pelo pâncreas convertem os triacilgliceróis em ácidos

graxos e monoacilglicerol para absorção no intestino.



Glicocolato

Figura 22.4 Glicocolato. Os sais biliares, como o glicocolato, facilitam a digestão dos lipídios no intestino.

Os lipídios alimentares são transportados em quilomícrons

Nas células da mucosa intestinal, os triacilgliceróis são novamente sintetizados a partir de ácidos graxos e monoacilgliceróis e, a seguir, acondicionados em partículas de transporte de lipoproteínas, denominadas *quilomícrons*, que consistem em partículas estáveis de aproximadamente 2.000 Å (200 nm) de diâmetro (Figura 22.5). Essas partículas são compostas principalmente de triacilgliceróis, tendo como principal componente proteico a apolipoproteína B-48 (apo B-48). Os constituintes proteicos das partículas de lipoproteínas são denominados *apolipoproteínas*. Os quilomícrons também transportam vitaminas lipossolúveis e colesterol.

Os quilomícrons são liberados no sistema linfático, e, a seguir, no sangue. Essas partículas ligam-se a lipases ligadas à membrana, principalmente no tecido adiposo e no músculo, onde os triacilgliceróis são, mais uma vez, degradados a ácidos graxos livres e monoacilglicerol para transporte no tecido. Em seguida, os triacilgliceróis são novamente sintetizados dentro da célula e armazenados. No músculo, podem ser oxidados para fornecer energia.

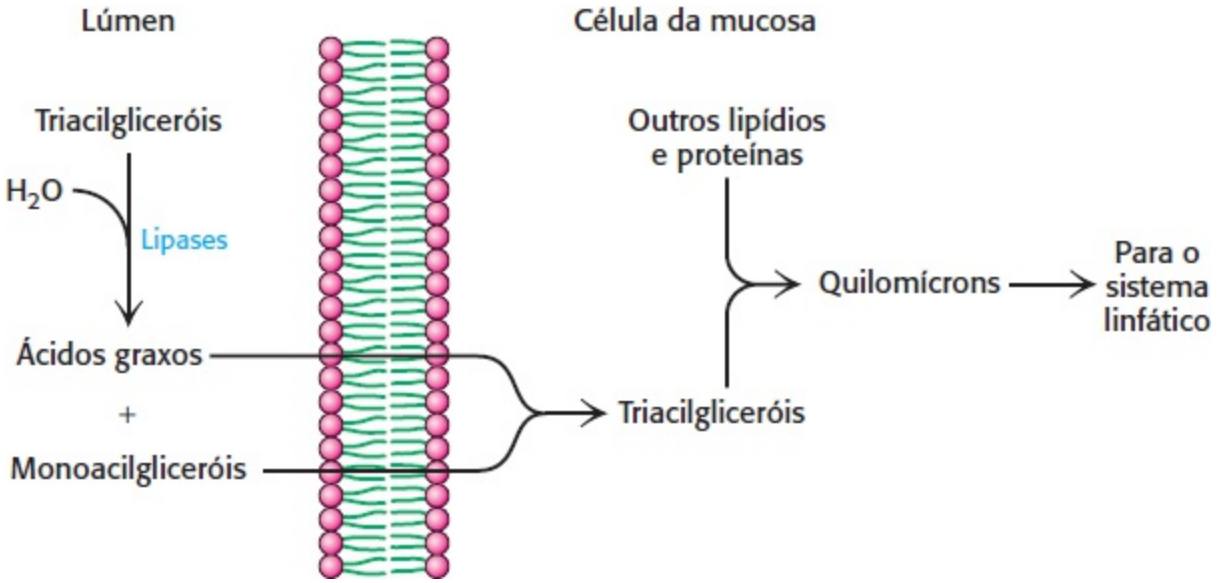
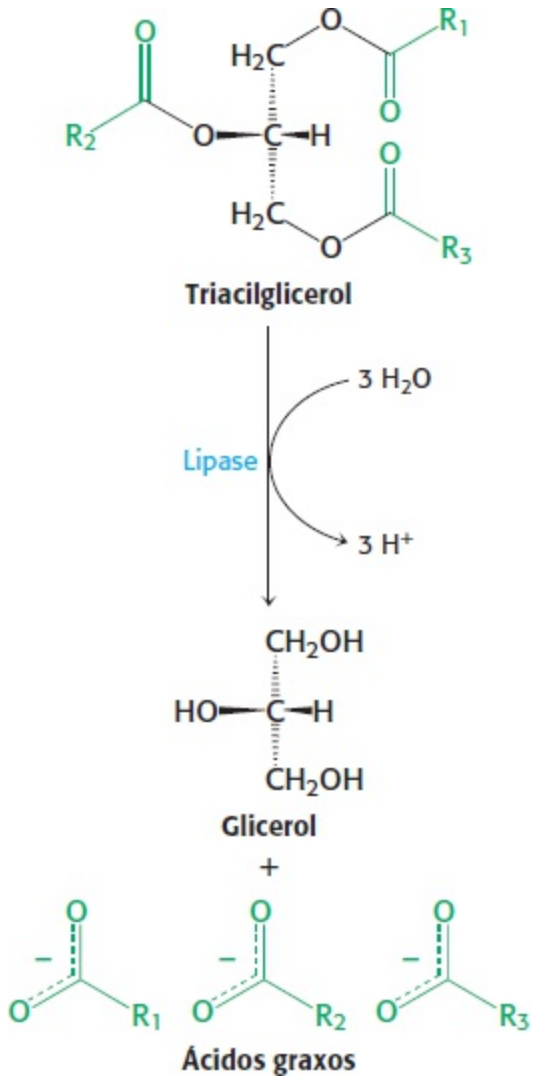


Figura 22.5 Formação de quilomícrons. Os ácidos graxos livres e os monoacilgliceróis são absorvidos pelas células epiteliais do intestino. Os triacilgliceróis são novamente sintetizados e acondicionados com outros lipídios e com a apolipoproteína B-48, formando quilomícrons, que, em seguida, são liberados no sistema linfático.

22.2 A utilização de ácidos graxos como fonte de energia requer três estágios de processamento

Os tecidos por todo o corpo têm acesso às reservas energéticas de lipídios armazenados no tecido adiposo por meio de três estágios de processamento. Em primeiro lugar, os lipídios precisam ser mobilizados. Nesse processo, os triacilgliceróis são degradados a ácidos graxos e glicerol, que são liberados do tecido adiposo e transportados até os tecidos que necessitam de energia. Em segundo lugar, nesses tecidos, os ácidos graxos precisam ser ativados e transportados para dentro das mitocôndrias para degradação. No terceiro estágio, os ácidos graxos são degradados passo a passo a acetil-CoA, que é então processada pelo ciclo do ácido cítrico.



Os triacilgliceróis são hidrolisados por lipases estimuladas por hormônios (lipases hormônio-sensíveis)

Imaginemos uma pessoa que acabou de acordar depois de uma noite de sono e começa uma sessão de exercícios. As reservas de glicogênio estão baixas, porém os lipídios estão prontamente disponíveis. Como essas reservas lipídicas são mobilizadas?

Para que as gorduras possam ser usadas como fonte de energia, os triacilgliceróis armazenados precisam ser hidrolisados para produzir ácidos graxos isolados. Essa reação é catalisada por uma lipase controlada por hormônios. Nas condições fisiológicas de um corredor no início da manhã, o

glucagon e a epinefrina estarão presentes. No tecido adiposo, esses hormônios deflagram receptores 7 TM que ativam a adenilato ciclase (Seção 14.1). O nível aumentado de AMP cíclico estimula então a proteína quinase A, que fosforila duas proteínas essenciais: a *perilipina*, uma proteína associada às gotículas de lipídio, e a lipase hormônio-sensível (Figura 22.6). A fosforilação da perilipina tem dois efeitos cruciais. Em primeiro lugar, ela reestrutura a gotícula de gordura, de modo que os triacilgliceróis sejam mais acessíveis à mobilização. Em segundo lugar, a fosforilação da perilipina desencadeia a liberação de um coativador da triglicerídio lipase do tecido adiposo (ATGL). A ATGL inicia a mobilização dos triacilgliceróis, liberando um ácido graxo do triacilglicerol, com formação de diacilglicerol. O diacilglicerol é convertido em um ácido graxo livre e monoacilglicerol pela lipase hormônio-sensível. Por fim, uma monoacilglicerol lipase completa a mobilização dos ácidos graxos, com produção de ácido graxo livre e glicerol. Por conseguinte, *a epinefrina e o glucagon induzem lipólise*. Embora seu papel no músculo não esteja tão bem estabelecido, esses hormônios provavelmente também regulam a utilização das reservas de triacilgliceróis nesse tecido.

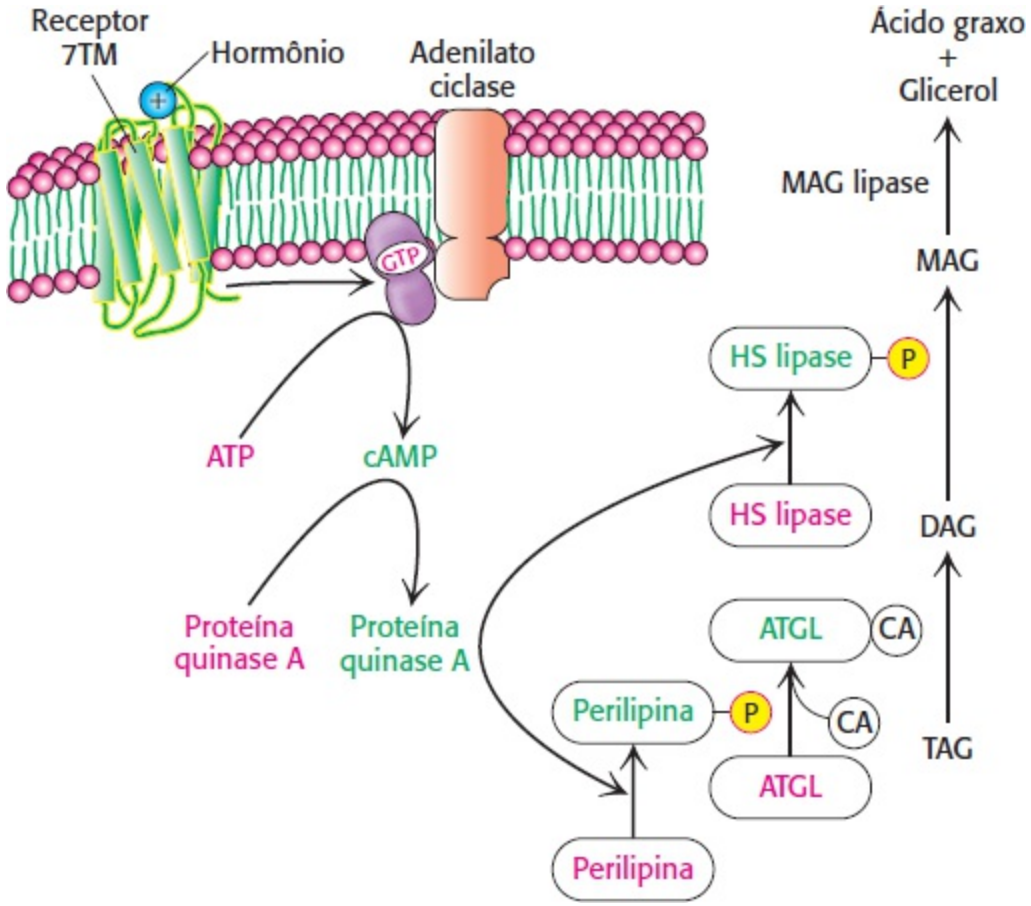
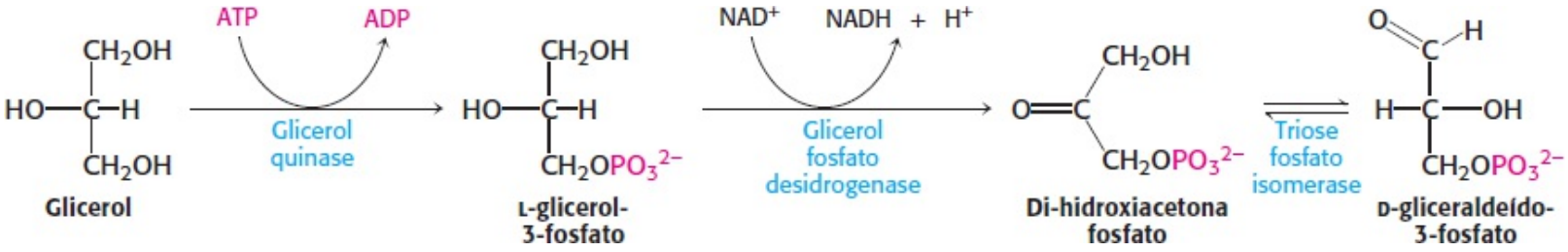


Figura 22.6 Mobilização dos triacilgliceróis. Os triacilgliceróis no tecido adiposo são convertidos em ácidos graxos livres em resposta a sinais hormonais. A fosforilação da perilipina reestrutura a gotícula de lipídio e libera o coativador de ATGL. A ativação da ATGL pela ligação a seu coativador inicia a mobilização. A lipase hormônio-sensível libera um ácido graxo do diacilglicerol. A monoacilglicerol lipase completa o processo de mobilização. Abreviaturas: 7TM, receptor transmembrânico que atravessa 7 vezes a membrana; ATGL, triglicerídio lipase do tecido adiposo; CA, coativador; HS lipase, lipase hormônio-sensível; MAG lipase, monoacilglicerol lipase; DAG, diacilglicerol; TAG, triacilglicerol.

Os ácidos graxos liberados não são solúveis no plasma sanguíneo, de modo que a albumina da corrente sanguínea liga-se aos ácidos graxos e atua como carreador. Por meio desses processos, os ácidos graxos livres tornam-se acessíveis como fonte de energia em outros tecidos. Nos tecidos, a proteína de transporte de ácidos graxos facilita o trânsito de ácidos graxos através da membrana

plasmática.

O glicerol formado pela lipólise é absorvido pelo fígado e fosforilado. Em seguida, é oxidado a di-hidroxiacetona fosfato, que é isomerizada a gliceraldeído 3-fosfato. Essa molécula é um intermediário tanto da via glicolítica quanto da gliconeogênica.



Por conseguinte, o glicerol pode ser convertido em piruvato ou em glicose no fígado, que contém as enzimas apropriadas (Figura 22.7). O processo inverso pode ocorrer pela redução da di-hidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato. A hidrólise por uma fosfatase produz então glicerol. Desse modo, o glicerol e os intermediários glicolíticos são prontamente interconversíveis.

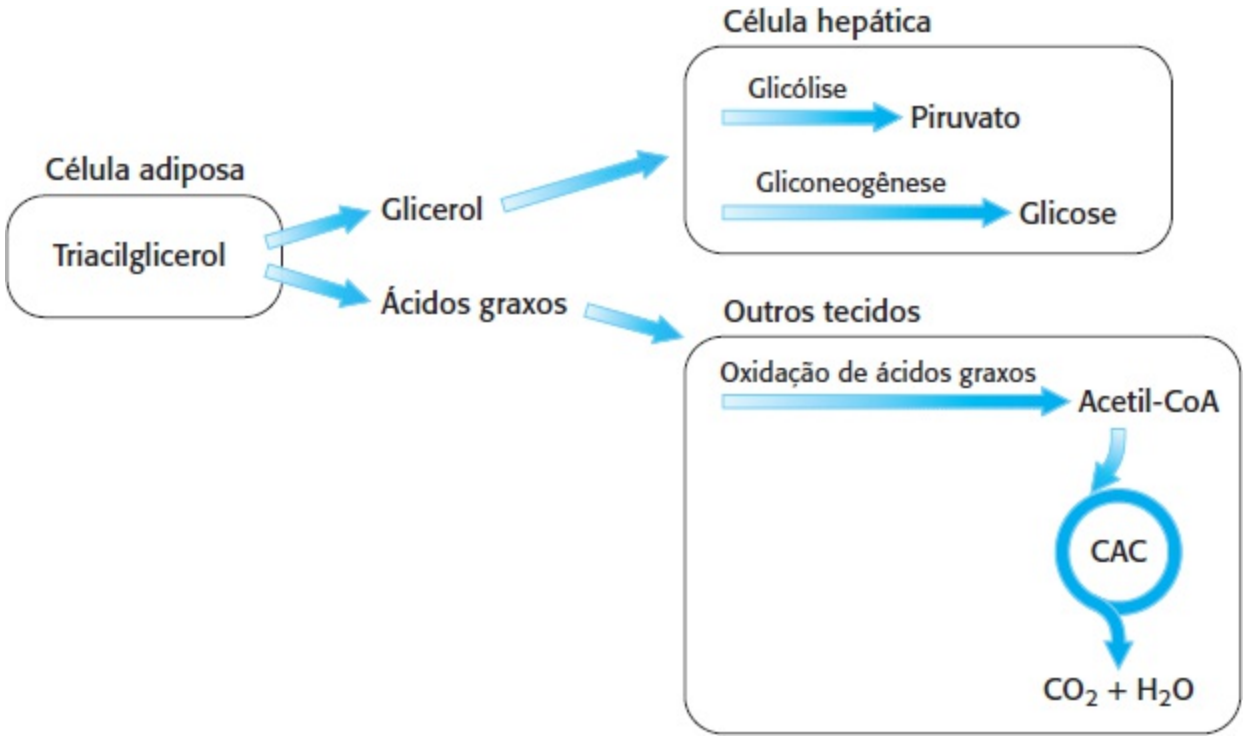
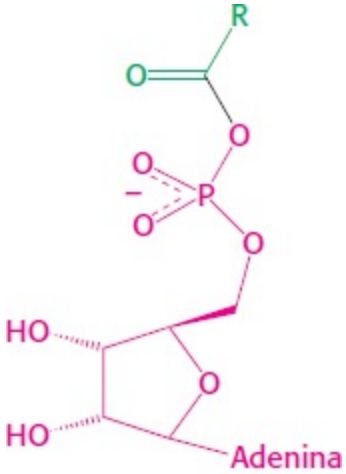


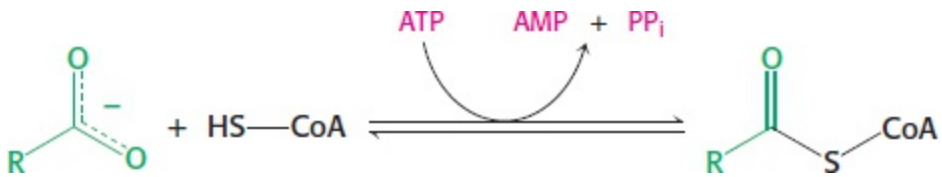
Figura 22.7 A lipólise gera ácidos graxos e glicerol. Os ácidos graxos são usados como fonte de energia por muitos tecidos. O fígado processa o glicerol pela via glicolítica ou pela via da gliconeogênese, dependendo das circunstâncias metabólicas. Abreviatura: CAC, ciclo do ácido cítrico.



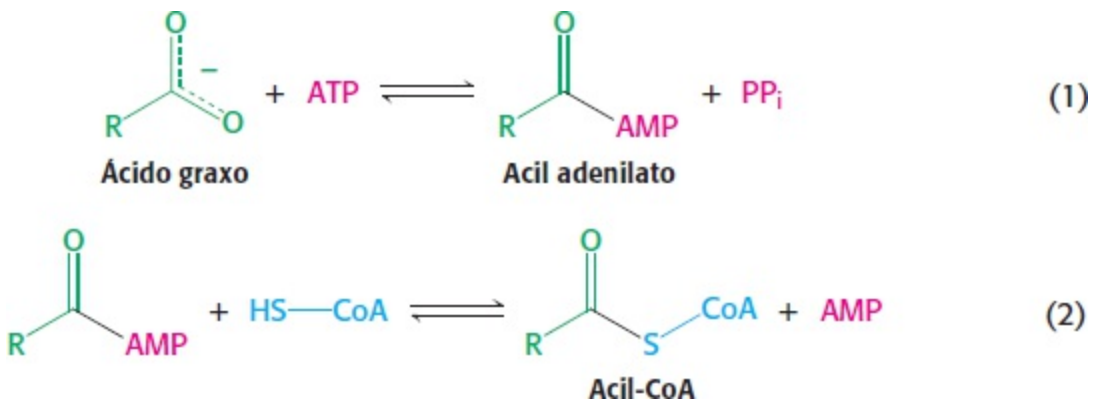
Acil adenilato

Os ácidos graxos são ligados à coenzima A antes de sua oxidação

Eugene Kennedy e Albert Lehninger mostraram, em 1949, que os ácidos graxos são oxidados nas mitocôndrias. Pesquisas subsequentes demonstraram que são inicialmente ativados por meio da formação de uma ligação tioéster com a coenzima A antes de entrarem na matriz mitocondrial. A adenosina trifosfato impulsiona a formação da ligação tioéster entre o grupo carboxila de um ácido graxo e um grupo sulfidrila da coenzima A. Essa reração de ativação ocorre na membrana mitocondrial externa, onde é catalisada pela *acil-CoA sintetase* (também denominada *ácido graxo tioquinase*).



Paul Berg mostrou que a ativação de um ácido graxo pela acil-CoA sintetase ocorre em duas etapas. Na primeira, o ácido graxo reage com ATP, formando um *acil adenilato*. Nesse anidrido misto, o grupo carboxila de um ácido graxo está ligado ao grupo fosforila do AMP. Os outros dois grupos fosforila do substrato ATP são liberados na forma de pirofosfato. Na segunda etapa, o grupo sulfidrila da coenzima A ataca o acil adenilato, que está firmemente ligado à enzima, formando acil-CoA e AMP.



Essas reações parciais são livremente reversíveis. Com efeito, a constante de equilíbrio para a soma dessas reações aproxima-se de 1. Um composto de alto potencial de transferência é clivado (entre

PP_i e AMP), e forma-se outro composto de alto potencial de transferência (o tioéster de acil-CoA). Como a reação global é impulsionada para frente? A resposta é que o pirofosfato é rapidamente hidrolisado pela pirofosfatase. A reação completa é

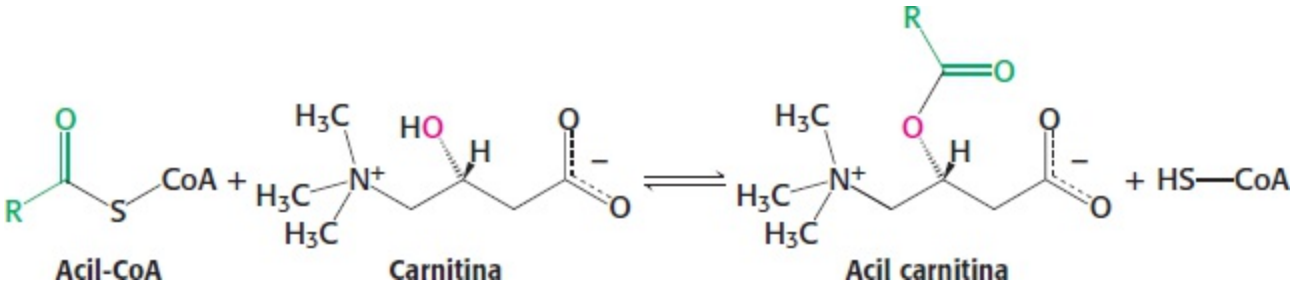
$$RCOO^- + CoA + ATP + H_20 \rightarrow$$
$$RCO\text{-}CoA + AMP + 2\ Pi + 2\ H^+$$

Essa reação é muito favorável, visto que o equivalente a duas moléculas de ATP é hidrolisado, enquanto apenas um composto de alto potencial de transferência é formado. Temos aqui outro exemplo de um tema recorrente em bioquímica: *muitas reações de biossíntese tornam-se irreversíveis pela hidrólise do pirofosfato inorgânico*.

Outro padrão também se repete nessa reação de ativação. O intermediário acil adenilato ligado à enzima não é exclusivo da síntese de acil-CoA. *Com frequência, formam-se acil adenilatos quando grupos carboxila são ativados em reações bioquímicas.* Os aminoácidos são ativados para a síntese de proteínas por um mecanismo semelhante (Seção 30.2), embora as enzimas que catalisam esse processo não sejam homólogas à acil-CoA sintetase. Por conseguinte, *a ativação por adenilação repete-se, em parte, devido à evolução convergente.*

A carnitina transporta ácidos graxos ativados de cadeia longa para a matriz mitocondrial

Os ácidos graxos são ativados na membrana mitocondrial externa, enquanto são oxidados na matriz mitocondrial. É necessário um mecanismo especial de transporte para levar os ácidos graxos ativados de cadeia longa através da membrana mitocondrial interna. Esses ácidos graxos precisam ser conjugados à *carnitina*, um álcool zwitteriônico. O grupo acila é transferido do átomo de enxofre da coenzima A para o grupo hidroxila da carnitina, formando *acil carnitina*. Essa reação é catalisada pela *carnitina aciltransferase I*, também denominada *carnitina palmitoil transferase I* (CTPI), que está ligada à membrana mitocondrial externa.



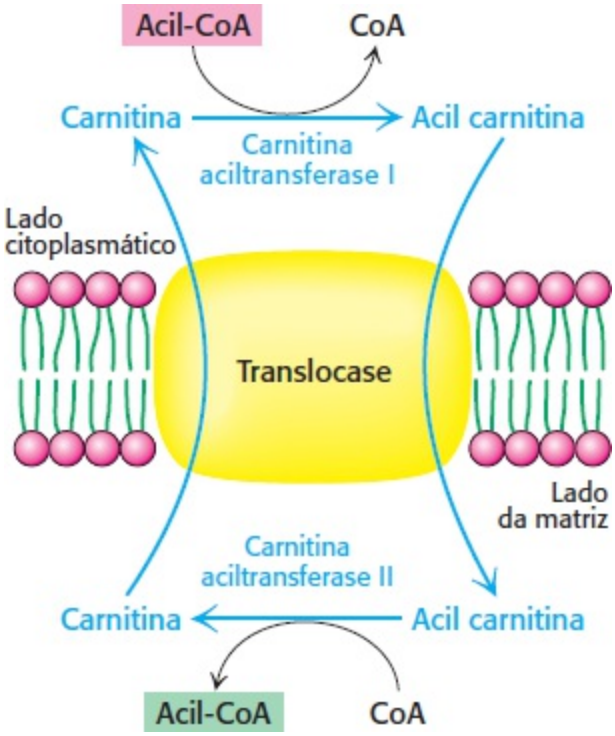
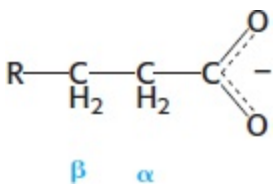


Figura 22.8 Acil carnitina translocase. A entrada de acil carnitina na matriz mitocondrial é mediada por uma translocase. A carnitina retorna ao lado citoplasmático da membrana mitocondrial interna em troca de acil carnitina.

A acil carnitina é então transportada através da membrana mitocondrial interna por uma translocase (Figura 22.8). O grupo acil é transferido de volta à coenzima A do lado da matriz da membrana. Essa reação, que é catalisada pela carnitina aciltransferase II (*carnitina palmitoil transferase II*), é simplesmente o inverso da reação que ocorre no citoplasma. A reação é termodinamicamente possível graças à natureza zwitteriônica da carnitina. A ligação *O*-acil na carnitina tem alto potencial de transferência de grupo, aparentemente porque, por serem zwittérions, a carnitina e seus ésteres sofrem solvatação diferente da maioria dos outros alcoóis e seus estéreis. Por fim, a translocase devolve a carnitina ao lado citoplasmático, em troca de uma acil carnitina que entra.

Diversas doenças têm sido atribuídas a uma deficiência de carnitina, de transferase ou de translocase. Os sintomas de deficiência de carnitina variam de cãibras musculares leves até fraqueza intensa, e até mesmo morte. O músculo, o rim e o coração constituem os tecidos primariamente acometidos. A fraqueza muscular durante o exercício prolongado constitui o sintoma de deficiência de carnitina acil transferases, visto que o músculo depende de ácidos graxos como fonte de energia a longo prazo. Os ácidos graxos de cadeia média (C_8-C_{10}) são normalmente oxidados nesses pacientes, pois eles não necessitam de carnitina para entrar nas mitocôndrias. Essas doenças mostram que *o fluxo comprometido de um metabólito de um compartimento celular para outro pode resultar em uma condição patológica.*



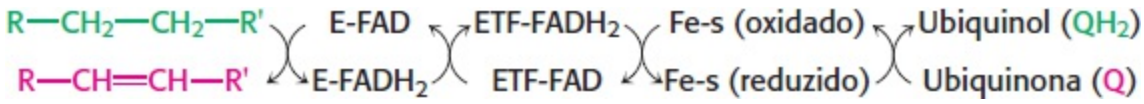
A acetil-CoA, o NADH e o $FADH_2$ são produzidos em cada ciclo de oxidação de ácidos graxos

Uma acil-CoA saturada é degradada por uma sequência repetitiva de quatro reações: oxidação pela flavina adenina dinucleotídio (FAD), hidratação, oxidação pelo NAD^+ e tiólise pela coenzima A (Figura 22.9). A cadeia de ácido graxo é encurtada em dois átomos de carbono em consequência dessas reações, e ocorre a produção de $FADH_2$, NADH e acetil-CoA. Como a oxidação ocorre no átomo de carbono β, essa série de reações é denominada *via da β oxidação*.

A primeira reação em cada ciclo de degradação consiste na *oxidação* da acil-CoA por uma *acil-CoA desidrogenase*, dando origem a uma enoil-CoA com dupla ligação trans entre C-2 e C-3.

$$\text{acil-CoA} + \text{E-FAD} \rightarrow \textit{trans}\text{-}\Delta^2\text{-enoil-CoA} + \text{E-FADH}_2$$

Como na desidrogenação do succinato no ciclo do ácido cítrico, a FAD, e não o NAD^+, é o aceptor de elétrons, visto que ΔG para essa reação não é suficiente para impulsionar a redução do NAD^+. Os elétrons do $FADH_2$, grupo prostético da acil-CoA desidrogenase reduzida, são transferidos para uma segunda flavoproteína, denominada *flavoproteína de transferência de elétrons* (ETF). Por sua vez, a ETF doa elétrons para a *ETF: ubiquinona redutase*, uma proteína ferro-enxofre. Por conseguinte, a ubiquinona é reduzida a ubiquinol, que libera seus elétrons de alto potencial para o segundo local de bombeamento de prótons da cadeia respiratória (Seção 18.3). Em consequência, ocorre a produção de 1,5 molécula de ATP por molécula de $FADH_2$ formada nessa etapa de desidrogenação, como na oxidação do succinato a fumarato.



A etapa seguinte consiste na *hidratação* da dupla ligação entre C-2 e C-3 pela *enoil-CoA hidratase.*

$$\textit{trans}\text{-}\Delta^2\text{-enoil-CoA} + H_2O \rightarrow \text{L-3-hidroxiacil-CoA}$$

Tabela 22.1 Principais reações na oxidação de ácidos graxos.

Etapa	Reações	Enzima
1	Ácido graxo + CoA + ATP ⇌ acil-CoA + AMP + PPi	Acil-CoA sintetase (também denominada ácido graxo tioquinase e ácido graxo-CoA ligase)*
2	Carnitina + acil-CoA ⇌ acil carnitina + CoA	Carnitina aciltransferase (também denominada carnitina palmitoil transferase)
3	Acil-CoA + E-FAD → trans-Δ²-enoil-CoA + $E\text{-}FADH_2$	Acil-CoA desidrogenase (várias isoenzimas com diferentes especificidades de comprimento de cadeia)
4	Trans-Δ²-enoil-CoA + H_2O ⇌ L-3-hidroacil-CoA	Enoil-CoA hidratase (também denominada crotonase ou 3-hidroxiacil-CoA hidroliase)
5	L-3-hidroxiacil-CoA + NAD^+ ⇌ 3-cetoacil-CoA + NADH + H^+	L-3-hidroxiacil-CoA desidrogenase

6	3-cetoacil-CoA + CoA $\rightleftharpoons$ acetil-CoA + acil-CoA (com menos C_2)	β-cetotiolase (também denominada tiolase)

*Ligase formadora de AMP.

A hidratação da enoil-CoA é estereoespecífica. Forma-se apenas o isômero L da 3-hidroxiacil-CoA quando a dupla ligação trans-Δ^2 é hidratada. A enzima também hidrata uma dupla ligação *Cis*-Δ^2, porém o produto, neste caso, é o isômero D. Retornaremos a esse ponto mais adiante, quando discutiremos como os ácidos graxos insaturados são oxidados.

A hidratação da enoil-CoA é um prelúdio para a segunda reação de *oxidação*, que converte o grupo oxila em C-3 em um grupo ceto, gerando NADH. Essa oxidação é catalisada pela *L-3-hidroxiacil-CoA desidrogenase*, que é específica para o isômero L do substrato hidroxiacila.

$$\text{L-3-hidroxiacil-CoA} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{3-cetoacil-CoA} + NADH + H^+$$

As reações precedentes oxidaram o grupo metileno em C-3 a um grupo ceto. A etapa final consiste na *clivagem* da 3-cetoacil-CoA pelo grupo tiol de uma segunda molécula de coenzima A, produzindo acetil-CoA e uma acil-CoA com dois átomos de carbono a menos. Essa clivagem tiolítica é catalisada pela β-*cetotiolase*.

$$\underset{(n \text{ carbonos})}{\text{3-Cetoacil-CoA}} + \text{HS-CoA} \rightleftharpoons \text{acetil-CoA} + \underset{(n-2 \text{ carbonos})}{\text{acil-CoA}}$$

A Tabela 22.1 fornece um resumo das reações na oxidação dos ácidos graxos.

A acil-CoA encurtada sofre, em seguida, outro ciclo de oxidação, começando com a reação catalisada pela acil-CoA desidrogenase (Figura 22.10). As cadeias de ácidos graxos que contêm 12 a 18 átomos de carbono são oxidadas pela acil-CoA desidrogenase de cadeia longa. A acil-CoA desidrogenase de cadeia média oxida cadeias de ácidos graxos de 14 a 4 carbonos, enquanto a acil-CoA desidrogenase de cadeia curta atua apenas sobre cadeias de ácidos graxos de 4 a 6 carbonos. Por outro lado, a β-cetotiolase, a hidroxiacil desidrogenase e a enoil-CoA hidratase atuam sobre moléculas de ácidos graxos de quase todos os comprimentos.

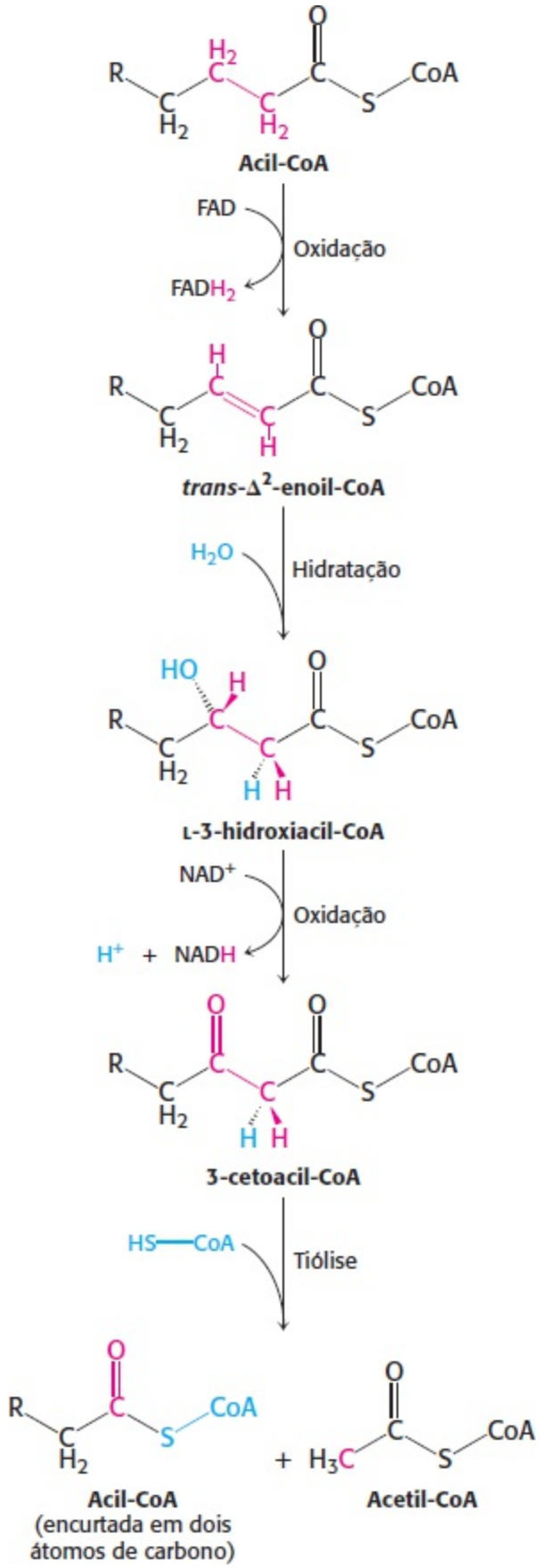


Figura 22.9 Sequência de reações para a degradação de ácidos graxos. Os ácidos graxos são degradados pela repetição de uma sequência de quatro reações, que consistem em oxidação, hidratação, oxidação e tiólise.

A oxidação completa do palmitato produz 106 moléculas de ATP

Podemos agora calcular o rendimento energético derivado da oxidação de um ácido graxo. Em cada ciclo de reações, uma acil-CoA é encurtada em dois átomos de carbono, e ocorre formação de uma

molécula de $FADH_2$, uma molécula de NADH e uma molécula de acetil-CoA.

$$C_n\text{-acil-CoA} + FAD + NAD^+ + H_2O + CoA \rightarrow$$
$$C_{n-2}\text{-acil-CoA} + FADH_2 + NADH + \text{acetil-CoA} + H^+$$

A degradação de palmitoil-CoA (C_{16}-acil-CoA) requer sete ciclos de reação. No sétimo ciclo, a tiólise da C_4-cetoacil-CoA produz duas moléculas de acetil-CoA. Por conseguinte, a estequiometria da oxidação de palmitoil-CoA é

$$\text{Palmitoil-CoA} + 7\ FAD + 7\ NAD^+ + 7\ CoA + 7\ H_2O \rightarrow$$
$$8\ \text{acetil-CoA} + 7\ FADH_2 + 7\ NADH + 7\ H^+$$

Aproximadamente 2,5 moléculas de ATP são produzidas quando cada uma dessas moléculas de NADH é oxidada pela cadeia respiratória, enquanto ocorre a formação de 1,5 molécula de ATP para cada $FADH_2$, visto que os elétrons entram na cadeia ao nível do ubiquinol. Convém lembrar que a oxidação da acetil-CoA pelo ciclo do ácido cítrico produz 10 moléculas de ATP. Por conseguinte, a quantidade de moléculas de ATP formadas na oxidação da palmitoil-CoA é de 10,5 a partir de sete $FADH_2$, de 17,5 a partir de sete NADH e de 80 a partir das oito moléculas de acetil-CoA, fornecendo um total de 108. O equivalente a duas moléculas de ATP é consumido na ativação do palmitato, em que o ATP é clivado em AMP e duas moléculas de ortofosfato. Por conseguinte, *a oxidação completa de uma molécula de palmitato produz 106 moléculas de ATP.*

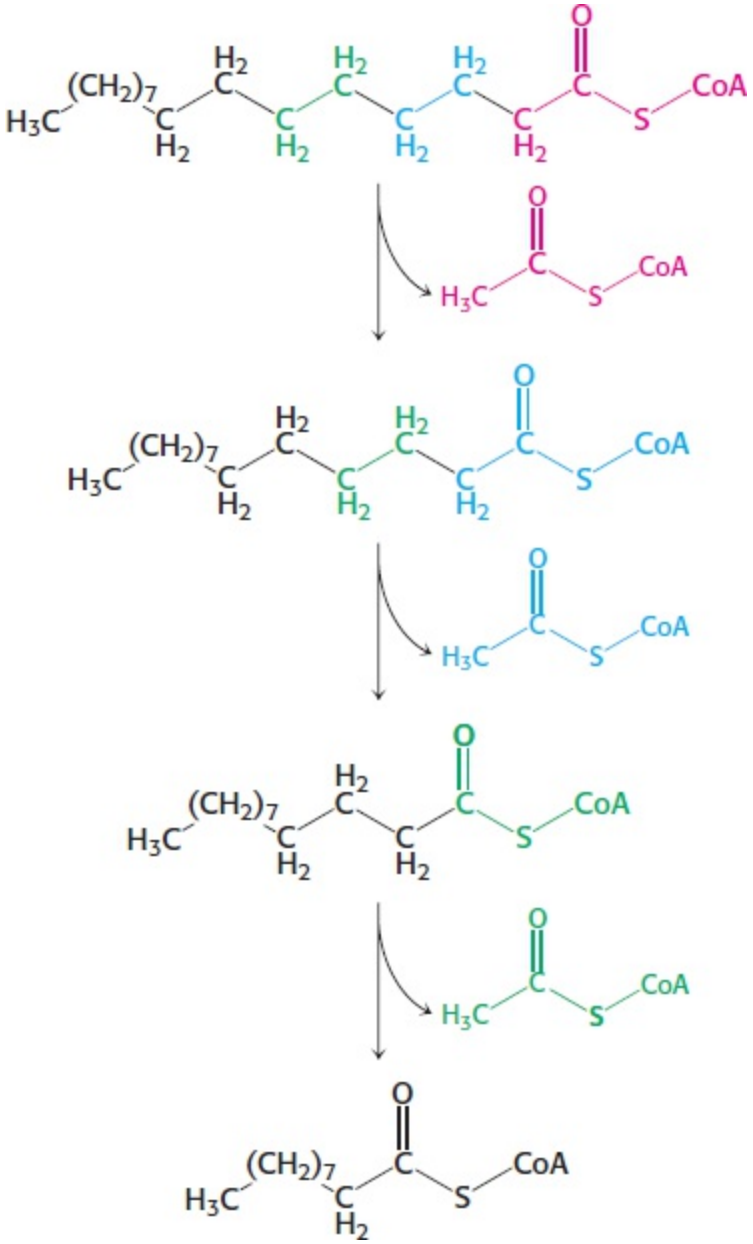


Figura 22.10 Primeiros três ciclos na degradação do palmitato. Unidades de dois carbonos são removidas sequencialmente da extremidade carboxila do ácido graxo.

22.3 Os ácidos graxos insaturados e de cadeia ímpar exigem etapas adicionais para a sua degradação

A via de β-oxidação é responsável pela degradação completa de ácidos graxos saturados com número par de átomos de carbono. A maioria de ácidos graxos apresenta essas estruturas, devido a seu modo de síntese (que será considerado posteriormente, neste capítulo). Entretanto, nem todos os ácidos graxos são tão simples. A oxidação de ácidos graxos que contêm duplas ligações exige duas etapas adicionais, assim como a oxidação de ácidos graxos contendo um número ímpar de átomos de carbono.

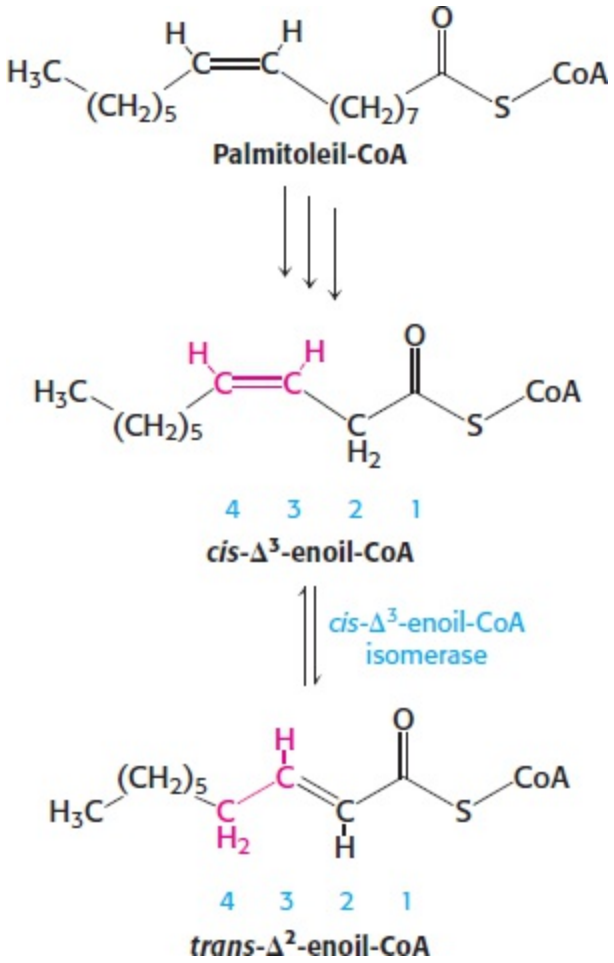


Figura 22.11 Degradação de um ácido graxo monoinsaturado. A *Cis*-Δ^3-enoil-CoA isomerase possibilita a β-oxidação contínua de ácidos graxos com uma única ligação dupla.

Uma isomerase e uma redutase são necessárias para a oxidação de ácidos graxos insaturados

A oxidação de ácidos graxos insaturados depara-se com algumas dificuldades; contudo, muitos desses ácidos estão disponíveis na alimentação. As reações são, em sua maioria, as mesmas que as dos ácidos graxos saturados. De fato, são necessárias apenas duas enzimas adicionais – uma isomerase e uma redutase – para degradar uma ampla variedade de ácidos graxos insaturados.

Consideremos a oxidação do palmitoleato (Figura 22.11). Esse ácido graxo insaturado C_{16}, que apresenta uma única dupla ligação entre C-9 e C-10 é ativado e transportado através da membrana mitocondrial interna do mesmo modo que os ácidos graxos saturados. Em seguida, a palmitoleil-CoA sofre três ciclos de degradação, que são efetuados pelas mesmas enzimas da oxidação de ácidos graxos saturados. Entretanto, a *cis*-Δ^3 enoil-CoA formada na terceira volta não é um substrato para a acil-CoA desidrogenase. A presença de uma dupla ligação entre C-3 e C-4 impede outra ligação dupla entre C-2 e C-3. Esse impasse é resolvido por uma nova reação que desloca a posição e a configuração da dupla ligação cis-Δ^3. A cis-Δ^3 enoil-CoA isomerase converte essa dupla ligação em uma dupla ligação trans-Δ_2. A dupla ligação situa-se agora entre C-2 e C-3. As reações subsequentes são as da via de oxidação dos ácidos graxos saturados, em que a *trans*-Δ^2 enoil-CoA é um substrato regular.

Os seres humanos necessitam de ácidos graxos poli-insaturados, que apresentam múltiplas ligações duplas, como importantes precursores de moléculas de sinalização; entretanto, os ácidos graxos poli-insaturados em excesso são degradados pela β-oxidação. Todavia, surge outro problema

com a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados. Consideremos o linoleato, um ácido graxo poli-insaturado C_{18} com duplas ligações cis-Δ^9 e cis-Δ^{12} (Figura 22.12). A dupla ligação cis-Δ^3 (entre os carbonos 3 e 4) formada após três ciclos de β-oxidação é convertida em uma dupla ligação trans-Δ^9 (entre os carbonos 2 e 3) pela isomerase mencionada anteriormente. A acil-CoA produzida por outro ciclo de β-oxidação contém uma dupla ligação cis-Δ^4 (entre os carbonos 4 e 5). A desidrogenação dessa espécie pela acil-CoA desidrogenase produz um *intermediário 2,4-dienoíla* (com dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 e entre os carbonos 4 e 5), que não é um substrato para a próxima enzima da via de β-oxidação. Esse impasse é contornado pela *2,4-dienoil-CoA redutase*, uma enzima que utiliza NADPH para reduzir o intermediário 2,4-dienoila a trans-Δ^3 enoil-CoA. A *cis*-Δ^3 enoil-CoA isomerase converte então a *trans*-Δ^3 enoil-CoA na forma trans-Δ^2, um intermediário habitual na via de β-oxidação. As estratégias catalíticas são elegantes e econômicas. Apenas duas enzimas adicionais são necessárias para a oxidação de qualquer ácido graxo poli-insaturado. *As duplas ligações em posição ímpar são processadas pela isomerase, enquanto aquelas em posição par são processadas pela redutase e a isomerase.*

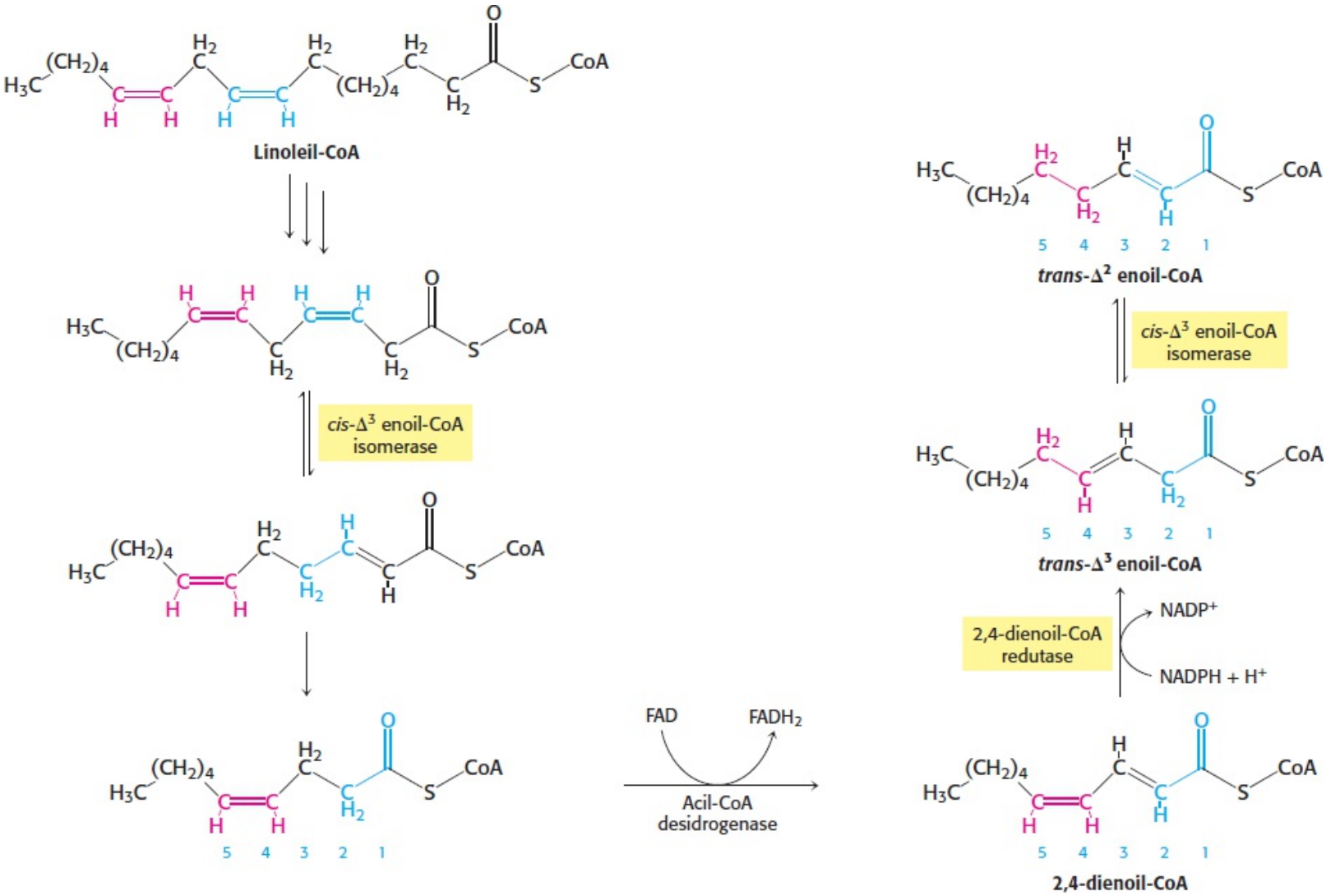


Figura 22.12 Oxidação da linoleil-CoA. A oxidação completa do ácido graxo di-insaturado, o linoleato, é facilitada pela atividade da enoil-CoA isomerase e da 2,4-dienoil-CoA redutase.

Os ácidos graxos de cadeia ímpar produzem propionil-CoA na etapa final de tiólise

Os ácidos graxos que apresentam um número ímpar de átomos de carbono são espécies secundárias.

São oxidados da mesma maneira que os ácidos graxos com número par, exceto que a propionil-CoA e a acetil-CoA, em lugar de duas moléculas de acetil-CoA, são produzidas no ciclo final de degradação. A unidade de três carbonos ativada na propionil-CoA entra no ciclo do ácido cítrico após ter sido convertida em succinil-CoA.

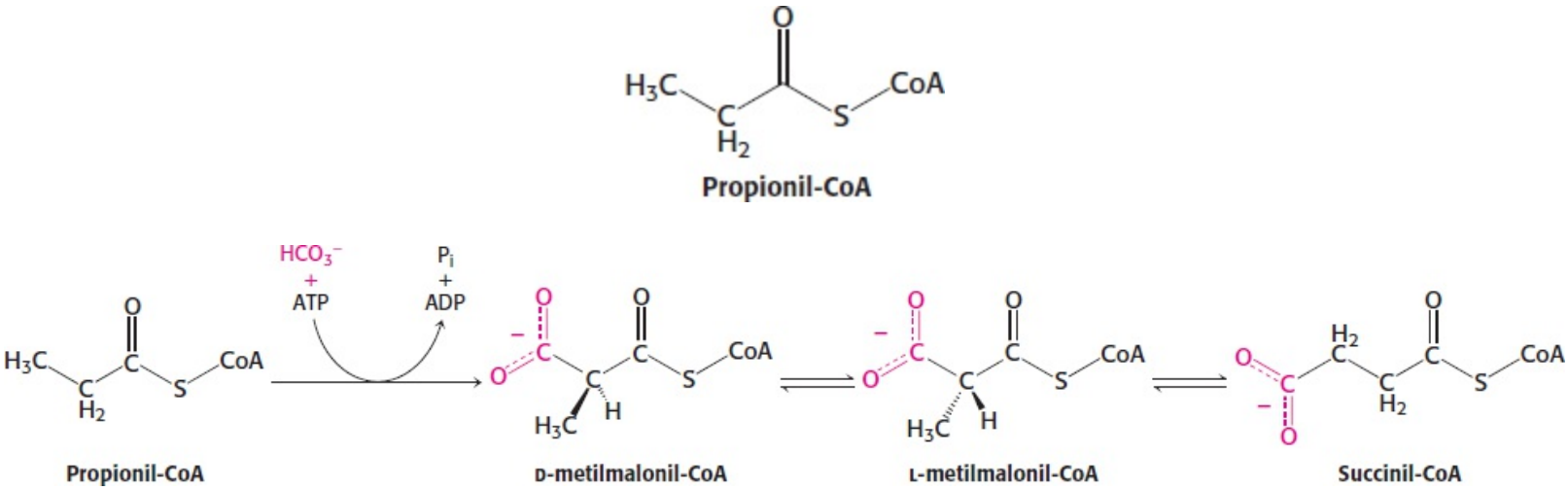


Figura 22.13 Conversão da propionil-CoA em succinil-CoA. A propionil-CoA, produzida a partir de ácidos graxos com número ímpar de carbonos, bem como a partir de alguns aminoácidos, é convertida em succinil-CoA, um intermediário do ciclo do ácido cítrico.

A via da propionil-CoA até succinil-CoA é particularmente interessante, visto que envolve um rearranjo que necessita de *vitamina B_{12}* (também conhecida como *cobalamina*). A propionil-CoA é carboxilada à custa da hidrólise de uma molécula de ATP, originando o isômero D da metilmalonil-CoA (Figura 22.13). Essa reação de carboxilação é catabolizada pela *propionil-CoA carboxilase*, uma enzima que tem como grupo prostético a biotina e que apresenta um mecanismo catalítico semelhante ao da enzima homóloga, a piruvato carboxilase. O isômero D da metilmalonil-CoA é racemizado ao isômero L, o substrato de uma mutase que o converte em *succinil-CoA por um rearranjo intramolecular.* O grupo —CO—S—CoA migra do C-2 para um grupo metila, em troca de um átomo de hidrogênio. Essa isomerização muito incomum é catalisada pela *metilmalonil-CoA mutase*, que contém um derivado da cobalamina como coenzima.

A vitamina B_{12} contém um anel corrínico e um átomo de cobalto

As enzimas de cobalamina, que estão presentes na maioria dos organismos, catalisam três tipos de reações: (1) *rearranjos intramoleculares*; (2) *metilações*, como na síntese de metionina; e (3) *redução de ribonucleotídios a desoxirribonucleotídios* (Seção 25.3). Nos mamíferos, são conhecidas apenas duas reações que necessitam da coenzima B_{12}. A conversão da L-metilmalonil-CoA em succinil-CoA é uma dessas reações, a outra é a formação de metionina pela metilação da homocisteína. A última reação é particularmente importante, visto que a metionina é necessária para a produção de coenzimas que participam na síntese de purinas e da timina, que são necessárias para a síntese de ácidos nucleicos.

O cerne da cobalamina consiste em um *anel corrínico com um átomo de cobalto central* (Figura 22.14). O anel corrínico, à semelhança de uma porfirina, tem *quatro unidades pirrólicas*. Duas delas estão diretamente ligadas entre si, enquanto as outras são unidas por pontes de metino, como nas porfirinas. O anel corrínico é mais reduzido que o das porfirinas, e os substituintes são diferentes.

Um átomo de cobalto está ligado aos quatro nitrogênios pirrólicos. O quinto substituinte ligado ao átomo de cobalto é um derivado de *dimetilbenzimidazol*, que contém ribose 3-fosfato e amino isopropanol. Um dos átomos de nitrogênio do dimetilbenzimidazol está ligado ao átomo de cobalto. Na coenzima B_{12}, o *sexto substituinte* ligado ao átomo de cobalto é uma *unidade 5 -desoxiadenosil*. Essa posição também pode ser ocupada por um grupo ciano, um grupo metila ou outros ligantes. Em todos esses compostos, o cobalto está no estado de oxidação + 3.

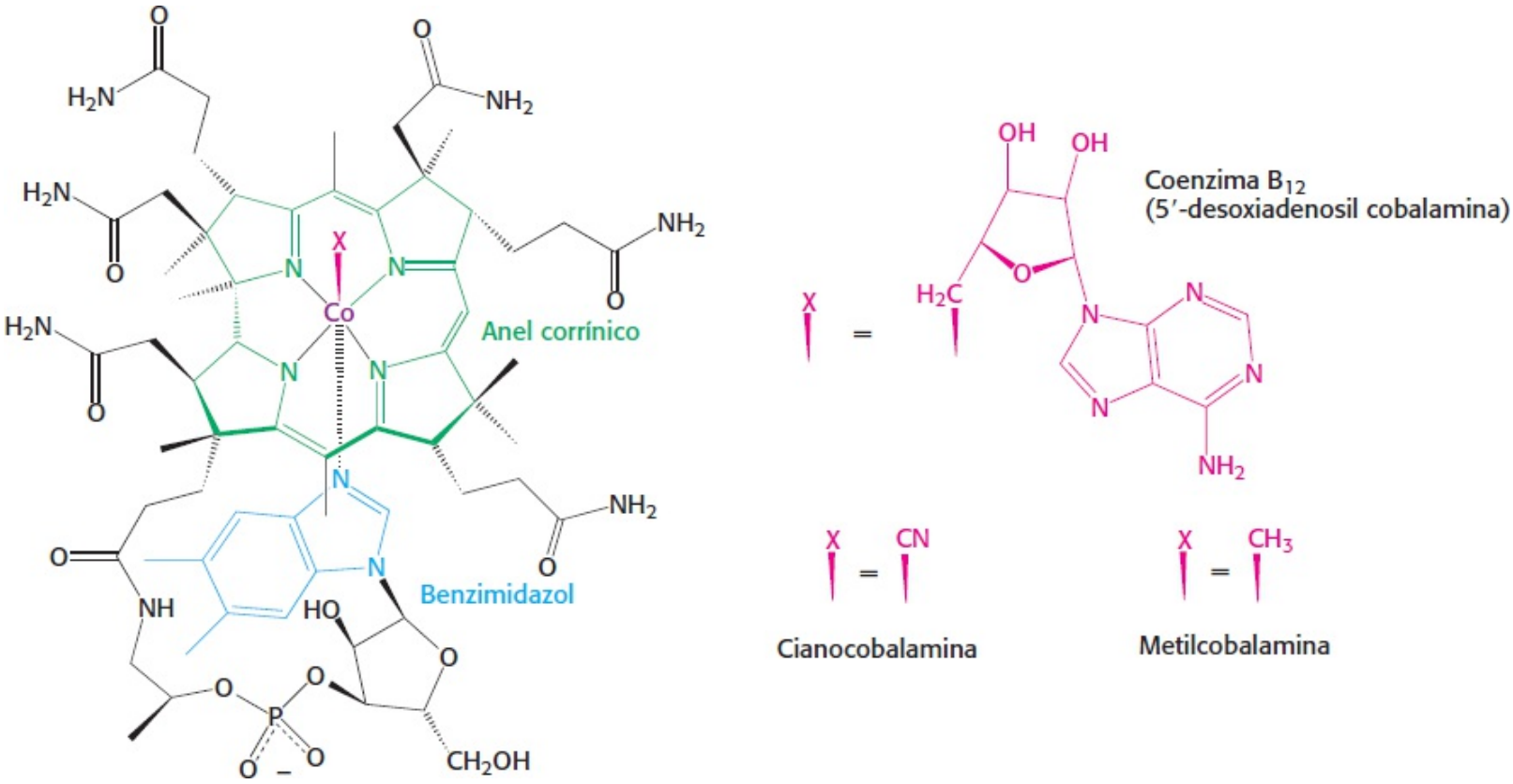


Figura 22.14 Estrutura da coenzima B_{12}. A coenzima B_{12} é uma classe de moléculas que variam dependendo do componente designado por X na estrutura da esquerda. A 5′-desoxiadenosil cobalamina é a forma da coenzima na metilmalonil mutase. A substituição de X por grupos ciano e metila cria a cianocobalamina e a metilcobalamina, respectivamente.

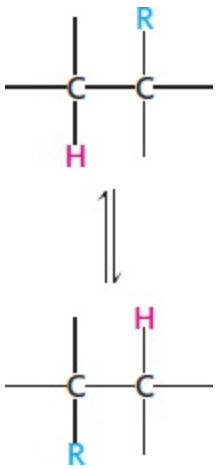


Figura 22.15 Reação de rearranjo catalisada por enzimas que requerem cobalamina. O grupo R pode ser um grupo amino, um grupo hidroxila ou um carbono substituído.

Mecanismo | A metilmalonil-CoA mutase catalisa um rearranjo, formando succinil-CoA

As reações de rearranjo catalisadas pela coenzima B_{12} são trocas de dois grupos unidos a átomos de carbono adjacentes do substrato (Figura 22.15). Um átomo de hidrogênio migra de um átomo de carbono para o seguinte, enquanto um grupo R (como o grupo —CO—S—CoA da metilmalonil-CoA) move-se concomitantemente no sentido inverso. A primeira etapa nesses rearranjos intramoleculares consiste na clivagem da ligação carbono-cobalto da 5′-desoxiadenosil cobalamina, gerando a forma Co^{2+} da coenzima e um radical 5′-desoxiadenosila —CH_2• (Figura 22.16). Nessa reação de clivagem homolítica, um elétron da ligação Co–C permanece com o Co (reduzindo-o do estado de oxidação + 3 para +2), enquanto o outro elétron permanece com o átomo de carbono, produzindo um radical livre. Em contrapartida, quase todas as outras reações de clivagem nos sistemas biológicos são *heterolíticas*: um par de elétrons é transferido para um dos dois átomos que estavam ligados.

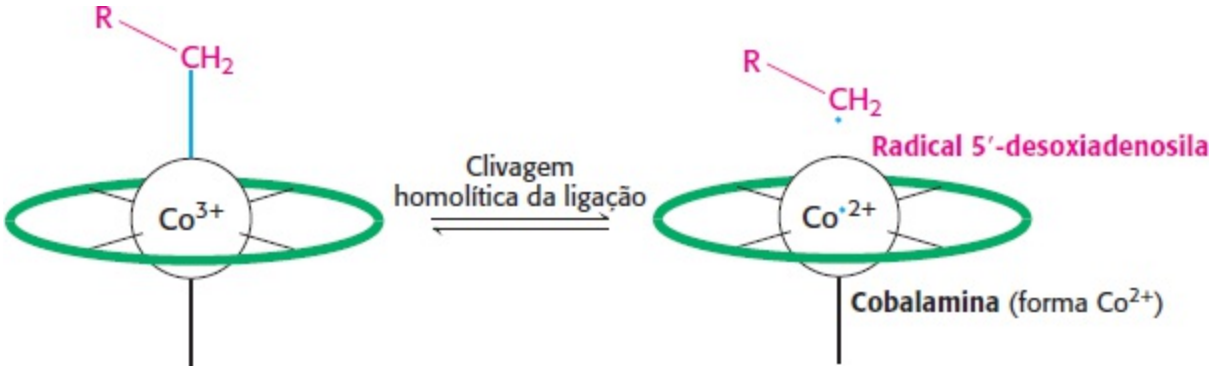


Figura 22.16 Formação de um radical 5 -desoxiadenosila. A reação da metilmalonil-CoA mutase começa com a clivagem homolítica da ligação que une o Co^{3+} da coenzima B_{12} a um átomo de carbono da ribose da porção adenosina da enzima. A clivagem produz um radical 5′-desoxiadenosila e leva à redução do Co^{3+} ao Co^{2+}. A letra R representa o componente 5′-desoxiadenosila da coenzima, enquanto o oval verde representa o restante da coenzima.

Qual é o papel desse radical —CH_2• muito incomum? Essa espécie altamente reativa retira um *átomo de hidrogênio* do substrato para formar 5′-desoxiadenosina e um radical do substrato (Figura 22.17). Esse radical do substrato sofre rearranjo espontâneo: o grupo carbonil-CoA migra para a posição anteriormente ocupada pelo H no átomo de carbono adjacente, produzindo um radical diferente. Esse radical do produto retira um átomo de hidrogênio do grupo metila da 5′-desoxiadenosina para completar o rearranjo e fazer com que a unidade desoxiadenosila retorne à forma de radical. *O papel da coenzima B_{12} nessas migrações intramoleculares consiste em atuar como fonte de radicais livres para a retirada de átomos de hidrogênio.*

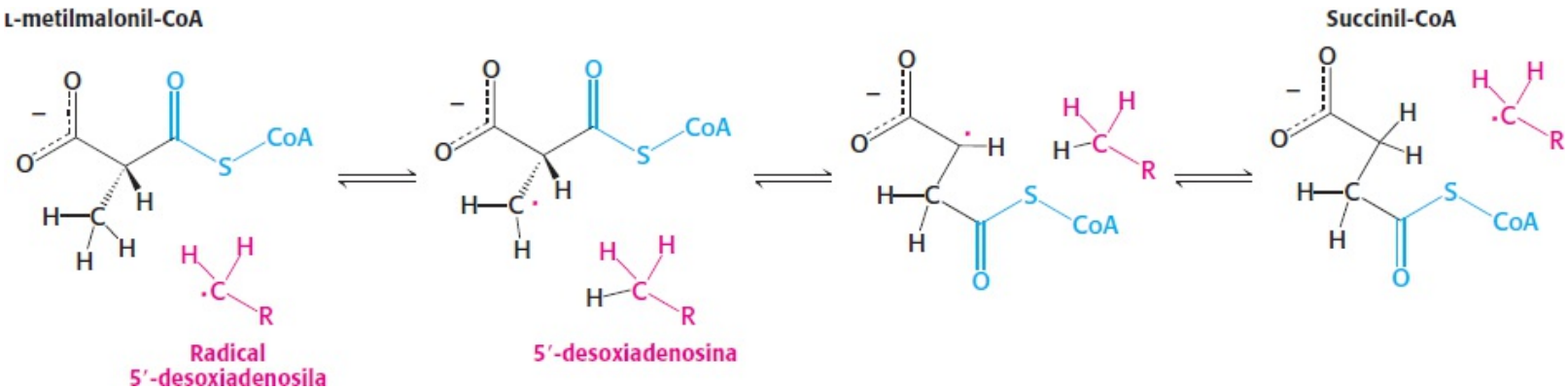


Figura 22.17 Formação de succinil-CoA por uma reação de rearranjo. Um radical livre retira um átomo de hidrogênio no rearranjo de metilmalonil-CoA em succinil-CoA.

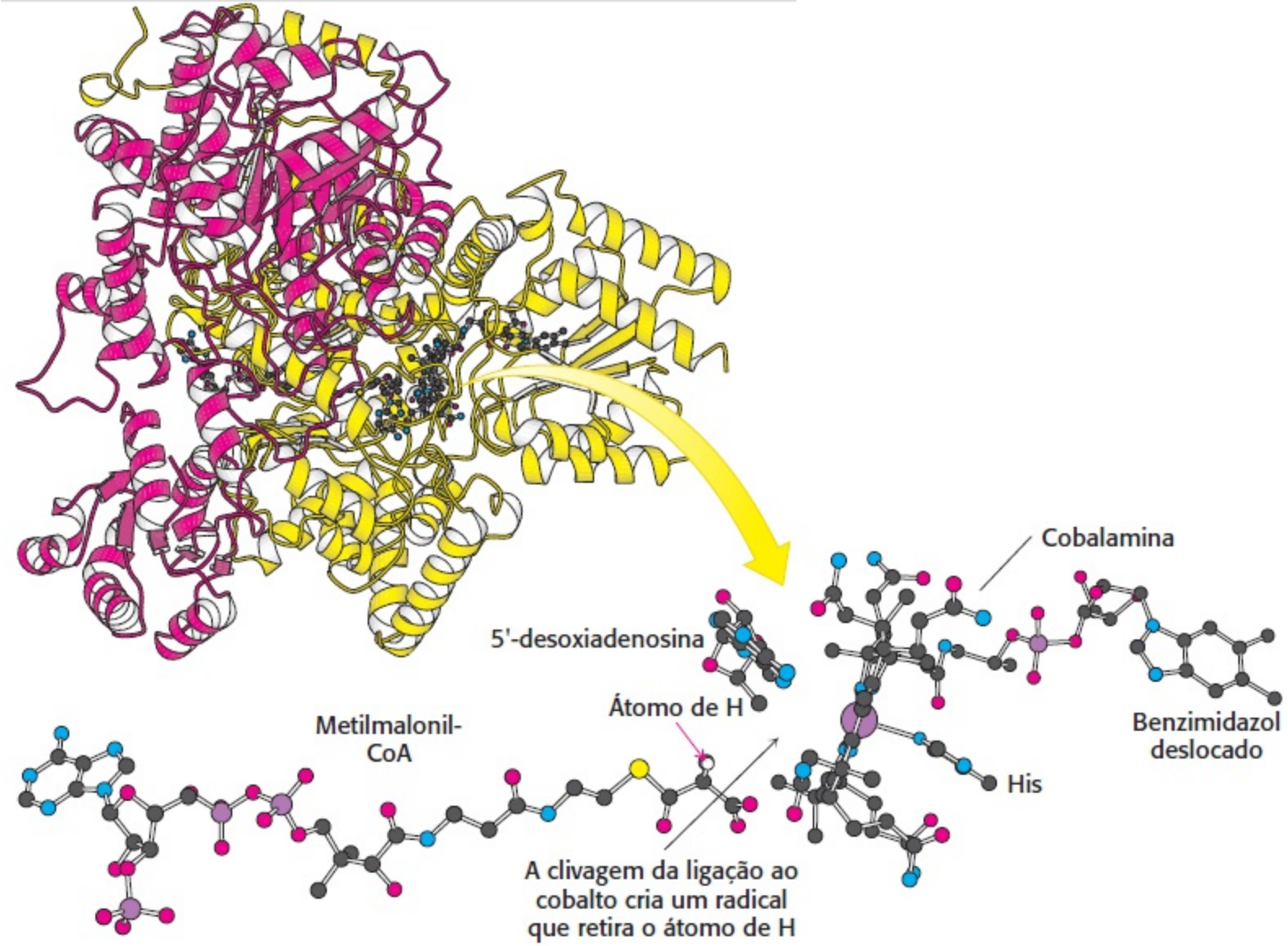


Figura 22.18 Sítio ativo da metilmalonil-CoA mutase. *Observe* que um resíduo de histidina da enzima liga-se ao cobalto no lugar do benzimidazol. Esse arranjo de substrato e coenzima no sítio ativo facilita a clivagem da ligação cobalto-carbono e a retirada subsequente de um átomo de hidrogênio do substrato. [Desenhada a partir de 4REQ.pdb.]

Uma propriedade essencial da coenzima B_{12} consiste na fraqueza de sua ligação cobalto-carbono, que é prontamente clivada, produzindo um radical. Para facilitar a clivagem dessa ligação, enzimas como a metilmalonil-CoA mutase deslocam o grupo benzimidazol da cobalamina e ligam o átomo de cobalto através de um resíduo de histidina (Figura 22.18). A aglomeração estérica ao redor da relação cobalto-carbono dentro do sistema do anel corrínico contribui para a fraqueza da ligação.

Os ácidos graxos também são oxidados nos peroxissomos

Embora a maior parte da oxidação dos ácidos graxos ocorra nas mitocôndrias, alguma oxidação desses ácidos pode ocorrer em organelas celulares, denominadas *peroxissomos* (Figura 22.19). Essas organelas consistem em pequenos compartimentos delimitados por membrana, que são encontrados nas células da maioria dos eucariotos. A oxidação dos ácidos graxos nessas organelas, que é interrompida na octanoil-CoA, pode servir para encurtar cadeias longas, tornando-as substratos mais apropriados para a β-oxidação nas mitocôndrias. A oxidação nos peroxissomos difere da β-oxidação na reação de desidrogenação inicial (Figura 22.20). Nos peroxissomos, a acil-CoA

desidrogenase, uma flavoproteína, transfere elétrons do substrato para o $FADH_2$ e, em seguida, para O_2, produzindo H_2O_2, em lugar de capturar elétrons de alta energia como $FADH_2$ para uso na cadeia de transporte de elétrons, conforme observado na β-oxidação mitocondrial. Os peroxissomos contêm altas concentrações da enzima catalase para degradar o H_2O_2 em água e O_2. As etapas subsequentes são idênticas àquelas de seus equivalentes nas mitocôndrias, embora sejam efetuadas por diferentes isoformas das enzimas.

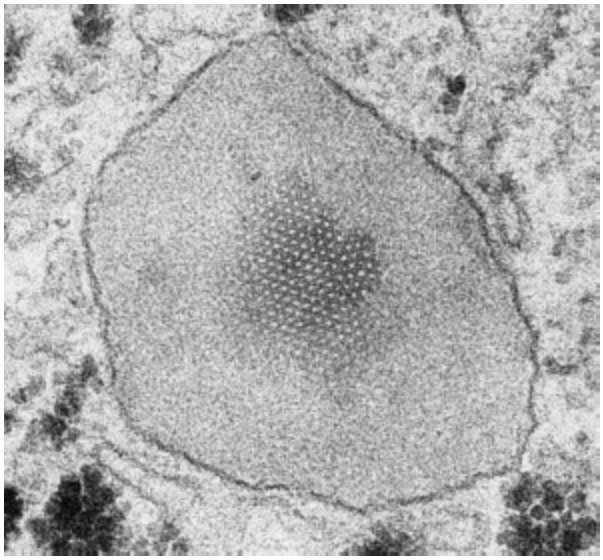


Figura 22.19 Micrografia eletrônica de um peroxissomo em uma célula hepática. Observa-se a presença de um cristal de urato oxidase dentro da organela, que é circundada por uma única membrana de dupla camada. As estruturas granulares escuras fora do peroxissomo são partículas de glicogênio. [Cortesia do Dr. George Palade.]

Os peroxissomos não funcionam em pacientes com síndrome de Zellweger. Anormalidades hepáticas, renais e musculares habitualmente levam à morte do indivíduo por volta dos 6 anos de idade. A síndrome é causada por um defeito na importação de enzimas para dentro dos peroxissomos. Temos aqui uma condição patológica que resulta de uma distribuição celular inapropriada de enzimas.

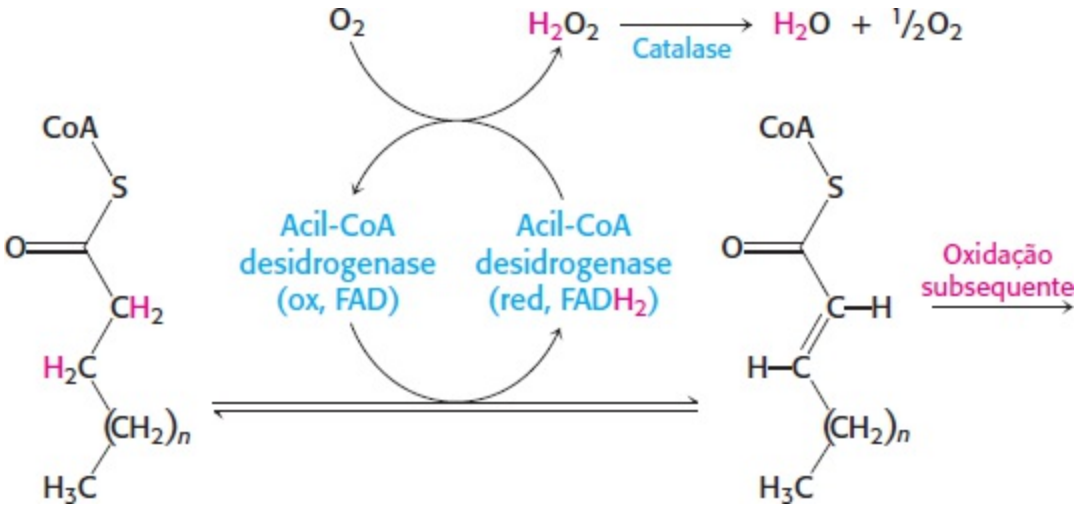


Figura 22.20 Início da degradação peroxissômica de ácidos graxos. A primeira desidratação na degradação de ácidos graxos nos peroxissomos requer uma flavoproteína desidrogenase, que transfere elétrons de sua porção $FADH_2$ para o O_2, produzindo H_2O_2.

Os corpos cetônicos são formados a partir da acetil-CoA quando predomina a degradação de lipídios

A acetil-CoA formada na oxidação de ácidos graxos só entra no ciclo de ácidos cítricos se a degradação de lipídios e de carboidratos estiver adequadamente equilibrada. A acetil-CoA precisa se combinar com o oxaloacetato para entrar no ciclo do ácido cítrico. Entretanto, a disponibilidade de oxaloaceto depende do suprimento adequado de carboidratos. Convém lembrar que o oxaloacetato é normalmente formado a partir do piruvato, o produto da degradação da glicose na glicólise. Se não houver disponibilidade de carboidratos, ou se estes forem inadequadamente utilizados, a concentração de oxaloacetato é reduzida, e a acetil-CoA não pode entrar no ciclo do ácido cítrico. Essa dependência constitui a base molecular do adágio de que *as gorduras queimam na chama dos carboidratos*.

No jejum ou no diabetes melito, o oxaloacetato, é consumido para formar glicose pela via gliconeogênica (Seção 16.3) e, portanto, não está disponível para condensação com acetil-CoA. Nessas condições, a acetil-CoA é desviada para a formação de acetoacetato e D-3-hidroxibutirato. O acetoacetato, o D-3-hidroxibutirato e a acetona são frequentemente designados como *corpos cetônicos*. Verifica-se a presença de níveis anormalmente altos de corpos cetônicos no sangue de diabéticos não tratados.

O acetoacetato é formado a partir da acetil-CoA em três etapas (Figura 22.21). Duas moléculas de acetil-CoA condensam-se, formando acetoacetil-CoA. Essa reação, que é catalisada pela tiolase, é o inverso da etapa de tiólise na oxidação de ácidos graxos. Em seguida, a acetoacetil-CoA reage com acetil-CoA e água, produzindo 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) e CoA. Essa condensação assemelha-se àquela catalisada pela citrato sintase (Seção 17.2). Essa reação, que apresenta um equilíbrio favorável devido à hidrólise de uma ligação tioéster, compensa o equilíbrio desfavorável na formação de acetoacetil-CoA. Em seguida, a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA é clivada a acetil-CoA e acetoacetato. A soma dessas reações é

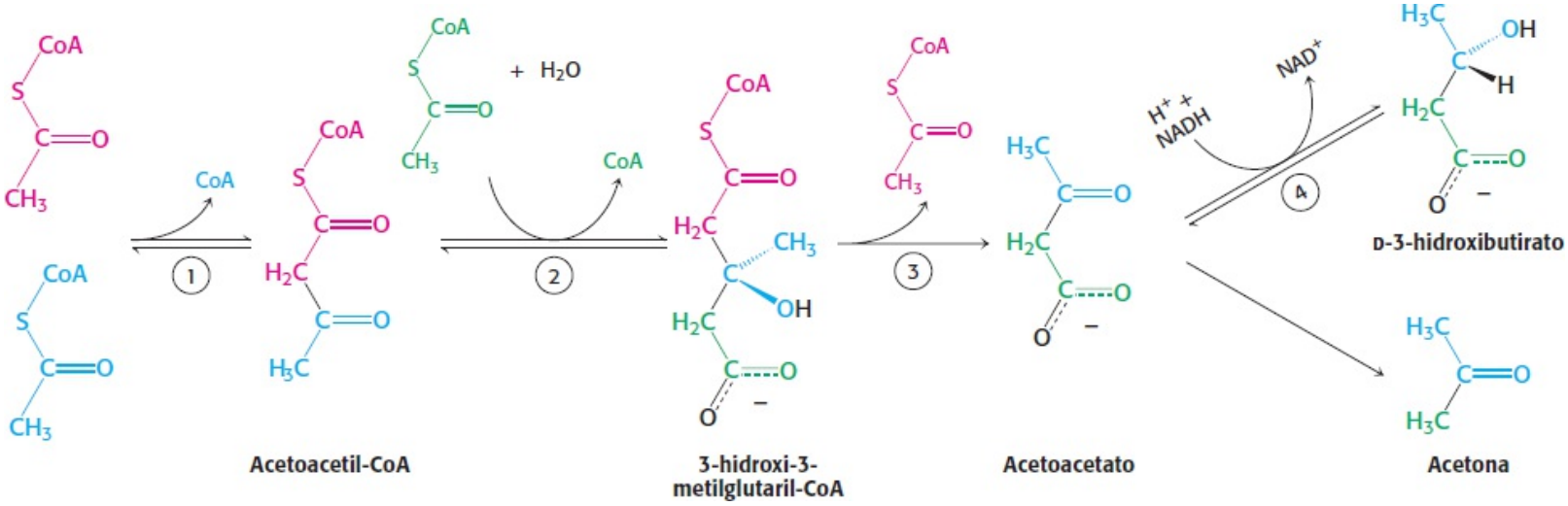


Figura 22.21 Formação dos corpos cetônicos. Os corpos cetônicos – acetoacetato, D-3-hidroxibutirato e acetona a partir da acetil-CoA – são formados principalmente no fígado. As enzimas que catalisam essas reações são (1) 3-cetotiolase, (2) hidroximetilglutaril-CoA sintase, (3) enzima de clivagem de hidroximetilglutaril-CoA, e (4) D-3-hidroxibutirato desidrogenase. O acetoacetato descarboxila-se espontaneamente, formando acetona.

$$2 \text{ acetil-CoA} + H_2O \rightarrow \text{acetoacetato} + 2 \text{ CoA} + H^+$$

O D-3-hidroxibutirato é formado pela redução do acetoacetato na matriz mitocondrial pela D-3-hidroxibutirato desidrogenase. A razão entre hidroxibutirato e acetoacetato depende da razão $NADH/NAD^+$ dentro das mitocôndrias.

O acetoacetato, por ser um β-cetoácido, também sofre descarboxilação espontânea e lenta a acetona. O odor de acetona pode ser detectado na respiração de uma pessoa com nível elevado de acetoacetato no sangue.

Os corpos cetônicos são uma fonte de energia importante em alguns tecidos

O fígado é o principal local de produção de acetoacetato e 3-hidroxibutirato. Essas substâncias difundem-se das mitocôndrias hepáticas para o sangue e são transportadas para outros tecidos, como o coração e os rins (Figura 22.22). O acetoacetato e 3-hidroxibutirato constituem combustíveis normais da respiração e são quantitativamente importantes como fontes de energia. Com efeito, o músculo cardíaco e o córtex renal usam preferencialmente o acetoacetato, em comparação com a glicose. Por outro lado, a glicose constitui a principal fonte de energia para o cérebro e os eritrócitos em um indivíduo bem nutrido, com uma dieta balanceada. Entretanto, o cérebro adapta-se à utilização de acetoacetato durante o jejum prolongado e na presença de diabetes melito. No jejum prolongado, 75% das necessidades energéticas do cérebro são supridos pelos corpos cetônicos.

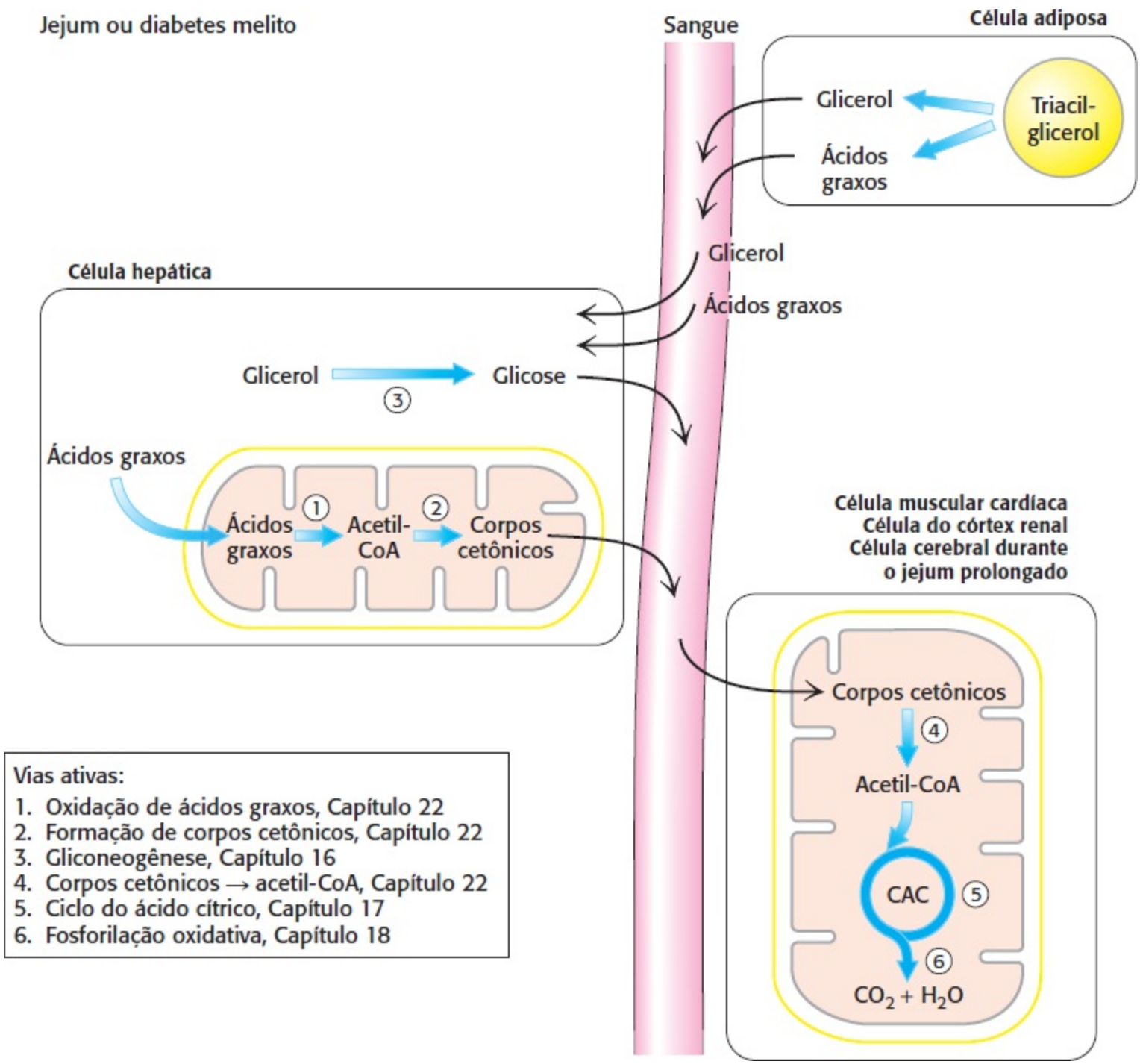


Figura 22.22 Integração de vias: o fígado fornece corpos cetônicos para os tecidos periféricos. Durante o jejum ou em pacientes não tratados com diabetes, o fígado converte ácidos graxos em corpos cetônicos, que constituem uma fonte de energia para diversos tecidos. A produção de corpos cetônicos é particularmente importante durante o jejum prolongado, quando os corpos cetônicos constituem a fonte de energia predominante.

O acetoacetato é convertido em acetil-CoA em duas etapas. Na primeira etapa, o acetoacetato é ativado pela transferência de CoA da succinil-CoA, em uma reação catalisada por uma CoA transferase específica. Na segunda etapa, a acetoacetil-CoA é clivada pela tiolase, produzindo duas moléculas de acetil-CoA, que podem então, entrar no ciclo do ácido cíclico (Figura 22.23). O fígado dispõe de acetoacetato para suprimento a outros órgãos, visto que ele carece dessa CoA transferase específica. O 3-hidroxibutirato necessita de uma etapa adicional para gerar acetil-CoA. É inicialmente oxidado para produzir acetoacetato, que é processado conforme já descrito, e NADH para uso na fosforilação oxidativa.

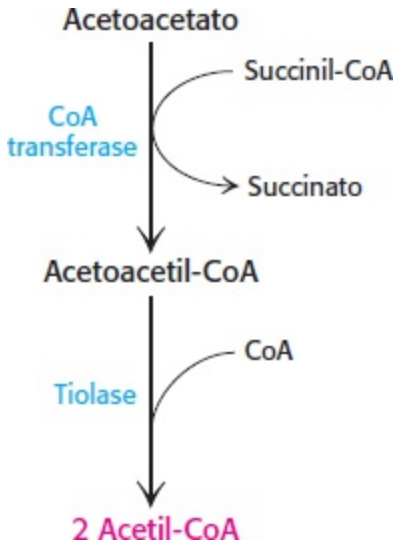
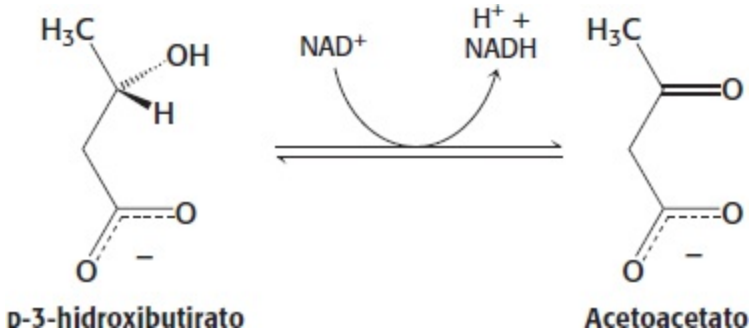


Figura 22.23 Utilização do acetoacetato como fonte de energia. O acetoacetato pode ser convertido em duas moléculas de acetil-CoA, que em seguida entram no ciclo do ácido cítrico.



Os corpos cetônicos podem ser considerados uma forma hidrossolúvel transportável de unidades acetila. Os ácidos graxos são liberados pelo tecido adiposo e convertido em unidades acetila pelo fígado, que em seguida as exporta na forma de acetoacetato. Como era de se esperar, o acetoacetato também desempenha um papel regulador. *Níveis elevados de acetoacetato no sangue significam uma abundância de unidades acetila e provocam redução da velocidade de lipólise no tecido adiposo.*

A ocorrência de níveis sanguíneos elevados de corpos cetônicos, que resulta de certas condições patológicas, é potencialmente fatal. A mais comum dessas condições é a cetose diabética em pacientes com diabetes melito insulinodependente. Esses pacientes são incapazes de produzir insulina. Conforme assinalado anteriormente, esse hormônio que normalmente é liberado depois das refeições sinaliza a captação de glicose pelos tecidos. Além disso, ele reduz a mobilização de ácidos graxos pelo tecido adiposo. A ausência de insulina tem duas consequências bioquímicas importantes (Figura 22.24). Em primeiro lugar, o fígado não pode absorver glicose e, em consequência, não pode fornecer oxaloacetato para processar a acetil-CoA derivada de ácidos graxos. Em segundo lugar, as células adiposas continuam liberando ácidos graxos na corrente sanguínea que são captados pelo fígado e convertidos em corpos cetônicos. Por conseguinte, o fígado produz grandes quantidades de corpos cetônicos, que são ácidos moderadamente fortes. O resultado consiste em acidose grave. A diminuição do pH prejudica a função tecidual, afetando mais gravemente o sistema nervoso central.

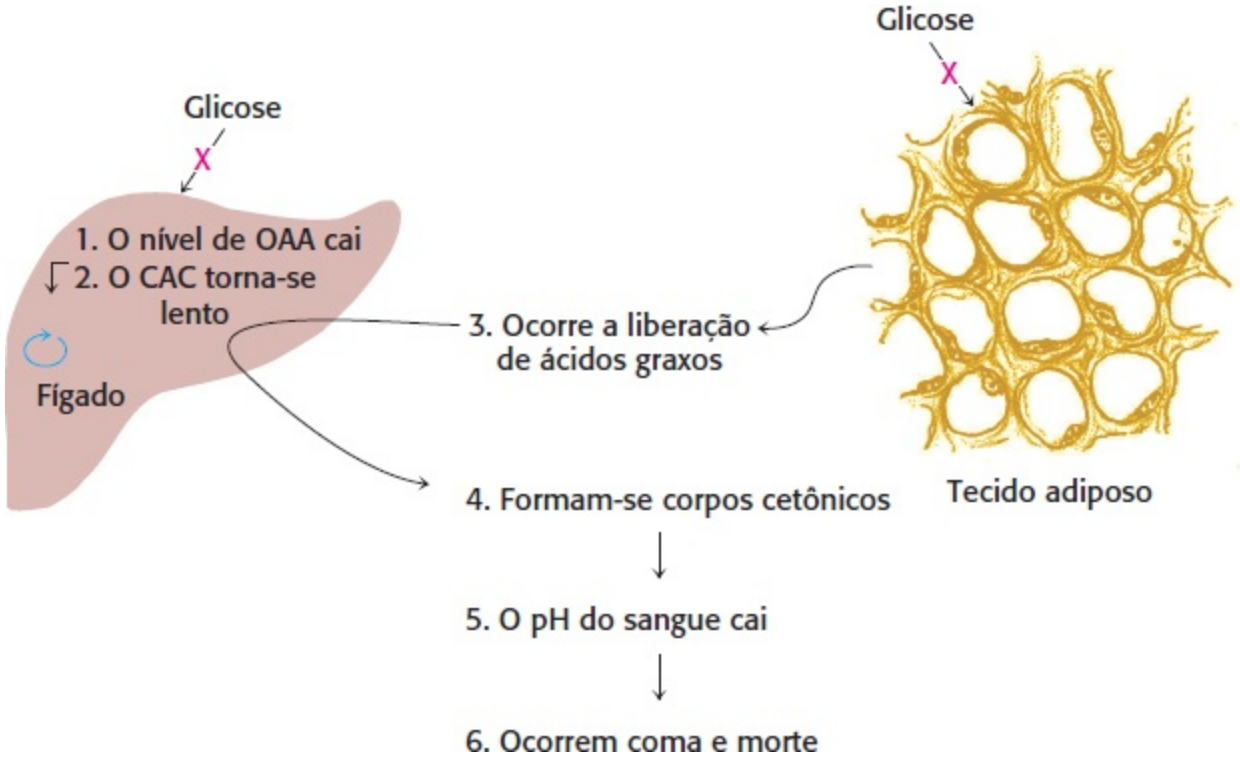


Figura 22.24 Ocorre cetose diabética quando a insulina está ausente. Na ausência de insulina, as gorduras são liberadas do tecido adiposo, e a glicose não pode ser absorvida pelo fígado ou pelo tecido adiposo. O fígado degrada os ácidos graxos por β-oxidação, mas não pode processar a acetil-CoA, por causa da ausência de oxaloacetato (OAA) derivado da glicose. Ocorre formação excessiva de corpos cetônicos, que são liberados no sangue.

É interessante mencionar que as dietas que promovem a formação de corpos cetônicos, denominadas dietas cetogênicas, são frequentemente usadas como opção terapêutica para crianças com epilepsia resistente a fármacos. As dietas cetogênicas são ricas em gorduras e pobres em carboidratos, com quantidades adequadas de proteína. Em essência, o corpo é forçado no modo do jejum prolongado, em que as gorduras e os corpos cetônicos passam a constituir a principal fonte de energia (Seção 27.5). Até o momento, não se sabe como essas dietas reduzem as convulsões nessas crianças.

Os animais são incapazes de converter os ácidos graxos em glicose

No ser humano típico, as reservas de gordura são muito maiores do que as de glicogênio. Todavia, o glicogênio é necessário como combustível para o músculo muito ativo, bem como para o cérebro, que normalmente só utiliza a glicose com fonte de energia. Quando as reservas de glicogênio estão baixas, por que o corpo não é capaz de utilizar as reservas de gordura e converter os ácidos graxos em glicose? A resposta é que *os animais são incapazes de efetuar a síntese efetiva de glicose a partir de ácidos graxos*. Especificamente, a acetil-CoA não pode ser convertida em piruvato ou em oxaloacetato nos animais. Lembre-se de que a reação que gera acetil-CoA a partir do piruvato é irreversível (Seção 17.1). Os dois átomos de carbono do grupo acetila da acetil-CoA entram no ciclo do ácido cítrico, porém dois átomos de carbono saem do ciclo nas descarboxilações catalisadas pela isocitrato desidrogenase e pela α-cetoglutarato desidrogenase. Em consequência, o oxaloacetato é regenerado, porém não é formado *de novo* quando a unidade acetila da acetil-CoA é oxidada pelo ciclo do ácido cítrico. Em essência, dois átomos de carbono entram no ciclo como grupo acetila, porém dois carbonos deixam o ciclo como Co_2 antes da produção de oxaloacetato. Consequentemente, não é possível ocorrer nenhuma síntese efetiva de oxaloacetato. Em

contrapartida, as plantas apresentam duas enzimas adicionais que possibilitam a conversão dos átomos de carbono da acetil-CoA em oxaloacetato (Seção 17.5).

22.4 Os ácidos graxos são sintetizados pela ácido graxo sintase

Os ácidos graxos são sintetizados por um complexo de enzimas denominado *ácido graxo sintase*. Como a alimentação ocidental típica atende nossas necessidades fisiológicas de gorduras e lipídios, os seres humanos adultos têm pouca necessidade de síntese de novo de ácidos graxos. Entretanto, muitos tecidos, como o fígado e o tecido adiposo, são capazes de sintetizar ácidos graxos, e essa síntese é necessária em determinadas condições fisiológicas. Por exemplo, a síntese de ácidos graxos é necessária durante o desenvolvimento embrionário e durante a lactação nas glândulas mamárias. A síntese inapropriada de ácidos graxos no fígado de alcoólicos contribui para a insuficiência hepática.

A acetil-CoA, o produto final da degradação de ácidos graxos, é o precursor de praticamente todos os ácidos graxos. O desafio bioquímico é ligar as unidades de dois carbonos e reduzir os carbonos para produzir palmitato, um ácido graxo C_{16}. O palmitato atua então como precursor de uma variedade de outros ácidos graxos.

Os ácidos graxos são sintetizados e degradados por vias diferentes

Embora a síntese de ácidos graxos seja o reverso da via de degradação em termos das reações químicas básicas envolvidas, as vias de síntese e de degradação diferem quanto a seu mecanismo, exemplificando mais uma vez o princípio de que *as vias de síntese e de degradação são quase sempre distintas*. A seguir listamos algumas diferenças importantes observadas entre as vias:

1. A síntese ocorre no *citoplasma*, diferentemente da degradação, que ocorre principalmente na matriz mitocondrial.

2. Os intermediários na síntese de ácidos graxos estão ligados covalentemente aos grupos sulfidrila de uma *proteína carreadora de acila* (ACP), enquanto os intermediários na degradação estão ligados covalentemente ao grupo sulfidrila da coenzima A.

3. As enzimas da síntese de ácidos graxos nos organismos superiores são unidas em uma *única cadeia polipeptídica, denominada ácido graxo sintase*. Por outro lado, as enzimas degradativas não parecem estar associadas.

4. A cadeia de ácido graxo em crescimento é alongada pela *adição sequencial de unidades de dois carbonos* derivadas da acetil-CoA. O doador ativado das unidades de dois carbonos na etapa de alongamento é a *malonil ACP*. A reação de alongamento é impulsionada pela liberação de CO_2.

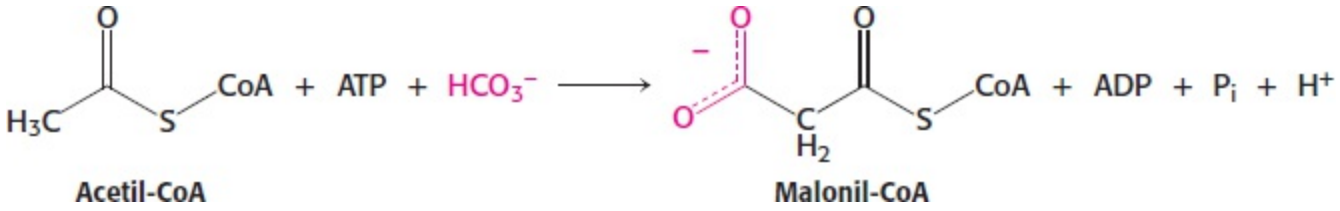
5. O redutor na síntese de ácidos graxos é o *NADPH*, enquanto os oxidantes na degradação de ácidos graxos são o NAD^+ e o *FAD*.

6. O alongamento pelo complexo da ácido graxo sintase é interrompido na formação do *palmitato* (C_{16}). O alongamento subsequente e a inserção de duplas ligações são efetuados por outros sistemas

enzimáticos.

A formação da malonil-CoA é a etapa limitante da síntese de ácidos graxos

A síntese de ácidos graxos começa com a carboxilação da acetil-CoA a *malonil-CoA*. Essa reação irreversível constitui a etapa limitante na síntese de ácidos graxos.



Acetil-CoA **Malonil-CoA**

A síntese de malonil-CoA é catalisada pela *acetil-CoA carboxilase*, que contém um grupo prostético de biotina. O grupo carboxila da biotina é ligado de modo covalente ao grupo amino de um resíduo de lisina, como na piruvato carboxilase (ver Figura 16.24) e na propionil-CoA carboxilase (p. 654). À semelhança dessas outras enzimas, forma-se um intermediário carboxibiotina à custa da hidrólise de uma molécula de ATP. O grupo CO_2 ativado nesse intermediário é então transferido para a acetil-CoA, formando malonil-CoA.

$$\text{Biotina-enzima} + \text{ATP} + HCO_3^- \rightleftharpoons CO_2\text{-biotina-enzima} + \text{ADP} + P_i$$

$$CO_2\text{-biotina-enzima} + \text{acetil-CoA} \rightarrow \text{malonil-CoA} + \text{biotina-enzima}$$

A acetil-CoA carboxilase também é a enzima reguladora essencial para o metabolismo dos ácidos graxos (Seção 22.5).

Os intermediários na síntese de ácidos graxos são fixados a uma proteína carreadora de acila

Os intermediários na síntese de ácidos graxos são ligados a uma proteína carreadora de acila. Especificamente, ligam-se à extremidade terminal sulfidrílica de um grupo fosfopanteteína. Na degradação de ácidos graxos, essa unidade está presente como parte da coenzima A, ao passo que, na sua síntese, está ligada a um resíduo de serina da proteína carreadora de acila (Figura 22.25). Por conseguinte, a ACP, que consiste em uma única cadeia polipeptídica de 77 resíduos, pode ser considerada um grupo prostético gigante, uma "macro-CoA".

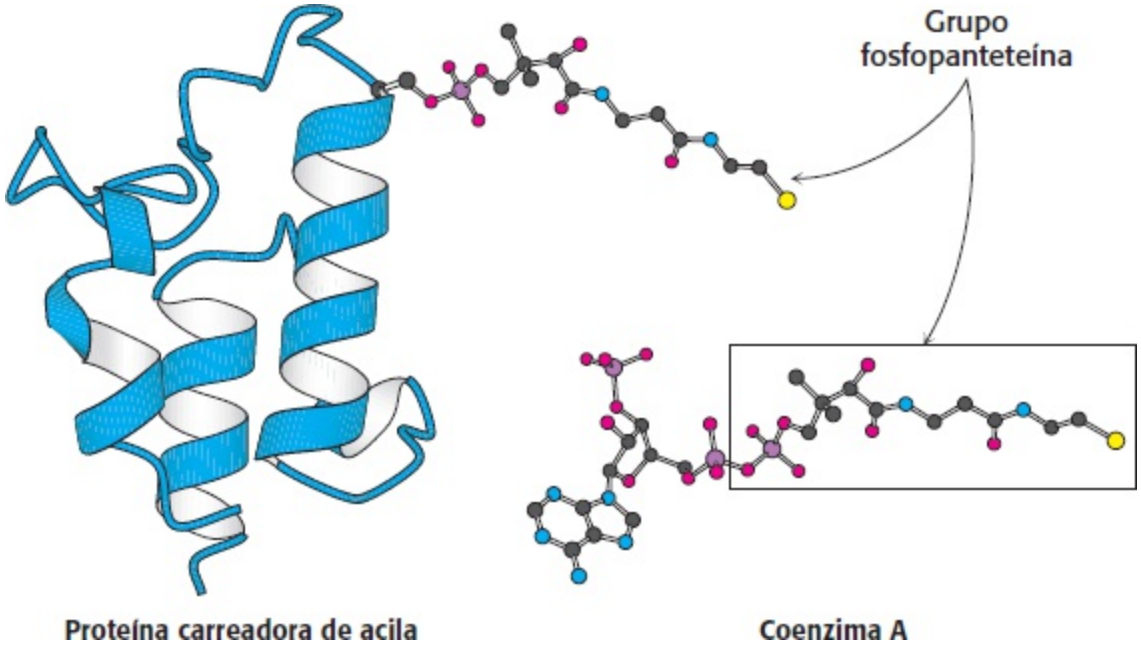


Figura 22.25 Fosfopanteteína. Tanto a proteína carreadora de acila quanto a coenzima A incluem a fosfopanteteína como sua unidade reativa.

A síntese de ácidos graxos consiste em uma série de reações de condensação, redução, desidratação e redução

O sistema enzimático que catalisa a síntese de ácidos graxos saturados de cadeia longa a partir da acetil-CoA, malonil-CoA e NADPH é denominado ácido graxo sintase. A sintase é, na realidade, um complexo de enzimas distintas. O complexo de ácido graxo sintetase nas bactérias dissocia-se prontamente nas enzimas individuais quando as células são rompidas. A disponibilidade nessas células isoladas ajudou os bioquímicos a elucidar as etapas na síntese de ácidos graxos (Tabela 22.2). Com efeito, as reações que levam à síntese de ácidos graxos nos organismos superiores são muito semelhantes àquelas das bactérias.

A fase de alongamento da síntese de ácidos graxos começa com a formação de acetil ACP e malonil ACP. A *acetil transacilase* e a *malonil transacilase* catalisam essas reações.

$$\text{Acetil-CoA} + \text{ACP} \rightarrow \text{acetil ACP} + \text{CoA}$$

$$\text{Malonil-CoA} + \text{ACP} \rightarrow \text{malonil ACP} + \text{CoA}$$

A malonil transacilase é altamente específica, enquanto a acetil transacilase pode transferir grupos acila diferentes da unidade acetila, embora com velocidade muito menor. A síntese de ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono começa com a propionil ACP, que é formada a partir da propionil-CoA pela acetil transacilase.

A acetil ACP e a malonil ACP reagem para formar acetoacetil ACP (Figura 22.26). A β-*cetoacil sintase*, também denominada enzima de condensação, catalisa essa reação de condensação.

$$\text{Acetil ACP} + \text{malonil ACP} \rightarrow \text{acetoacetil ACP} + \text{ACP} + CO_2$$

Tabela 22.2 Principais reações na síntese de ácidos graxos em bactérias.

Etapa	Reação	Enzima

1	Acetil-CoA + HCO_3^- + ATP → malonil-CoA + ADP + Pi + H^+	Acetil-CoA carboxilase
2	Acetil-CoA + ACP ⇌ acetil ACP + CoA	Acetil transacilase
3	Malonil-CoA + ACP ⇌ malonil ACP + CoA	Malonil transacilase
4	Acetil ACP + malonil ACP → acetoacetil ACP + ACP + CO_2	β-cetoacil sintase
5	Acetoacetil ACP + NADPH + H^+ ⇌ D-3-hidroxibutiril ACP + $NADP^+$	β-cetoacil redutase
6	D-3-hidroxibutiril ACP ⇌ crotonil ACP + H_2O	3-hidroxiacil desidratase
7	Crotonil ACP + NADPH + H^+ → butiril ACP + $NADP^+$	Enoil redutase

Na reação de condensação, forma-se uma unidade de quatro carbonos a partir de uma unidade de dois carbonos e uma unidade de três carbonos, com liberação de CO_2. Por que a unidade de quatro carbonos não é formada a partir de duas unidades de dois carbonos, isto é, duas moléculas de acetil ACP? A resposta é que o equilíbrio para a síntese de acetoacetil ACP a partir de duas moléculas de acetil ACP é altamente desfavorável. Em contrapartida*, o equilíbrio é favorável se a malonil ACP for um reagente, visto que a sua descarboxilação contribui com uma redução substancial de energia livre.* Com efeito, a reação de condensação é impulsionada pelo ATP, embora ele não participe diretamente na reação de condensação. Na verdade, o ATP é usado para carboxilar a acetil-CoA a malonil-CoA. Por conseguinte, a energia livre armazenada na malonil é liberada na descarboxilação que acompanha a formação de acetoacetil ACP. Embora o HCO_3^- seja necessário para a síntese de ácidos graxos, o seu átomo de carbono não aparece no produto. Em vez disso, *todos os átomos de carbono dos ácidos graxos que contêm um numero par de átomos de carbono derivam da acetil-CoA.*

As três etapas seguintes na síntese de ácidos graxos reduzem o grupo ceto em C-3 a um grupo metileno (Figura 22.26). Na primeira etapa, a acetoacetil ACP é reduzida a D-3-hidroxibutiril ACP pela β-cetoacil redutase. Essa reação difere da correspondente na degradação de ácidos graxos em dois aspectos: (1) forma-se o isômero D em lugar do L; e (2) o agente redutor é o NADPH, enquanto o agente oxidante na β-oxidação é o NAD^+. Essa diferença exemplifica o princípio geral de que o *NADPH é consumido em reações de biossíntese, enquanto o NADH é gerado em reações de produção de energia*. Em seguida, a D-3-hidroxibutiril ACP é desidratada para formar crotonil ACP, uma *trans*-$\Delta^2\Delta$-enoil ACP, pela 3-hidroxiacil desidratase. A etapa final no ciclo reduz a crotonil ACP a butiril ACP. O NADPH é mais uma vez o *redutor*, enquanto o FAD é o oxidante na reação correspondente na β-oxidação. A enzima bacteriana que catalisa essa etapa, a *enoil redutase*, pode ser inibida pela *triclosana*, um agente antimicrobiano de amplo espectro, que é adicionado a uma variedade de produtos, como pasta dental, sabonetes e cremes para a pele. Essas três últimas reações – uma redução, uma desidratação e uma segunda redução – convertem a acetoacetil ACP em butiril ACP, completando o primeiro ciclo de alongamento.

No segundo ciclo de síntese de ácidos graxos, ocorre condensação de butiril ACP com malonil ACP, formando uma C_6-β-cetoacil ACP. Essa reação assemelha-se àquela do primeiro ciclo, em que a acetil ACP se condensa com malonil ACP para formar uma C_4- β-cetoacil ACP. Uma redução, uma

desidratação e uma segunda redução convertem a C_6- β-cetoacil ACP em uma C_6-acil ACP, que está pronta para um terceiro ciclo de alongamento. Os ciclos de alongamento continuam até a formação de C_{16}-acil ACP. Esse intermediário constitui um bom substrato para uma tioesterase que hidrolisa a C_{16}-acil ACP, produzindo palmitato e ACP. *A tioesterase atua como uma régua para determinar o comprimento da cadeia de ácido graxo*. A síntese de ácidos graxos de cadeia maior é discutida na Seção 22.6.

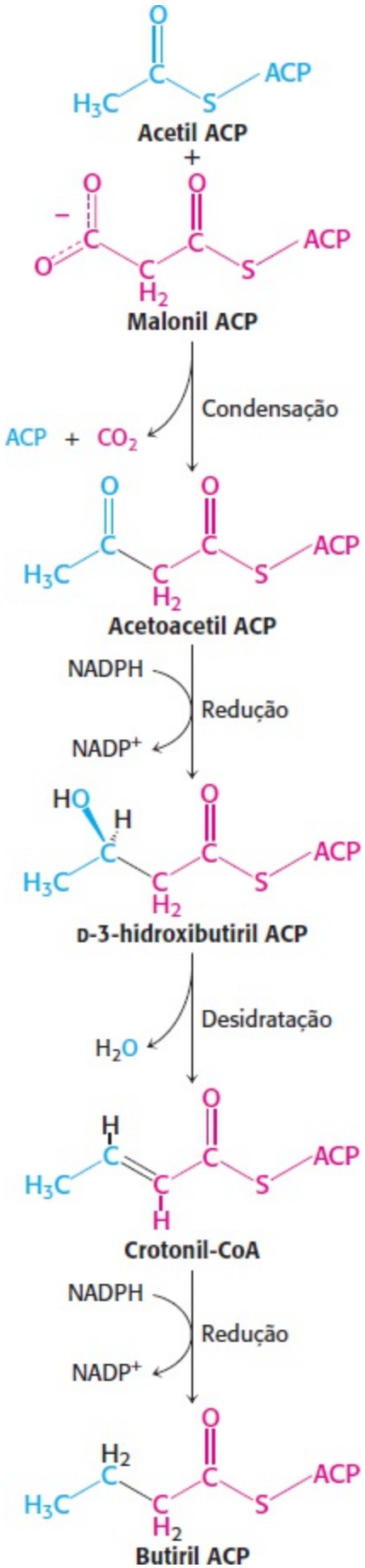


Figura 22.26 As etapas na síntese de ácidos graxos. A síntese de ácidos graxos começa com a condensação de malonil ACP e acetil ACP, formando acetoacetil ACP. A acetoacetil ACP é então reduzida, desidratada e novamente reduzida para formar butiril ACP. Outro ciclo começa com a condensação da butiril ACP e malonil ACP. A sequência de reações se repete até a formação do produto final, palmitato.

Os ácidos graxos são sintetizados por um complexo enzimático multifuncional nos animais

Embora as reações bioquímicas básicas na síntese de ácidos graxos sejam muito semelhantes em *E. coli* e nos eucariotos, a estrutura da sintase varia muito. As enzimas componentes das ácido graxo sintases de animais, diferentemente daquelas de *E. coli* e das plantas, estão unidas em uma grande cadeia polipeptídica.

A estrutura de grande parte da ácido graxo sintase de mamíferos foi recentemente determinada, porém a da proteína carreadora de acila e a da tioesterase ainda não foram resolvidas. A enzima é um dímero com subunidades idênticas com 270 kDa. Cada cadeia contém todos os sítios ativos necessários para a atividade, bem como uma proteína carreadora de acila unida ao complexo (Figura 22.27A). Embora cada cadeia possua todas as enzimas necessárias para a síntese de ácidos graxos, os monômeros não são ativos. É necessária a presença de um dímero.

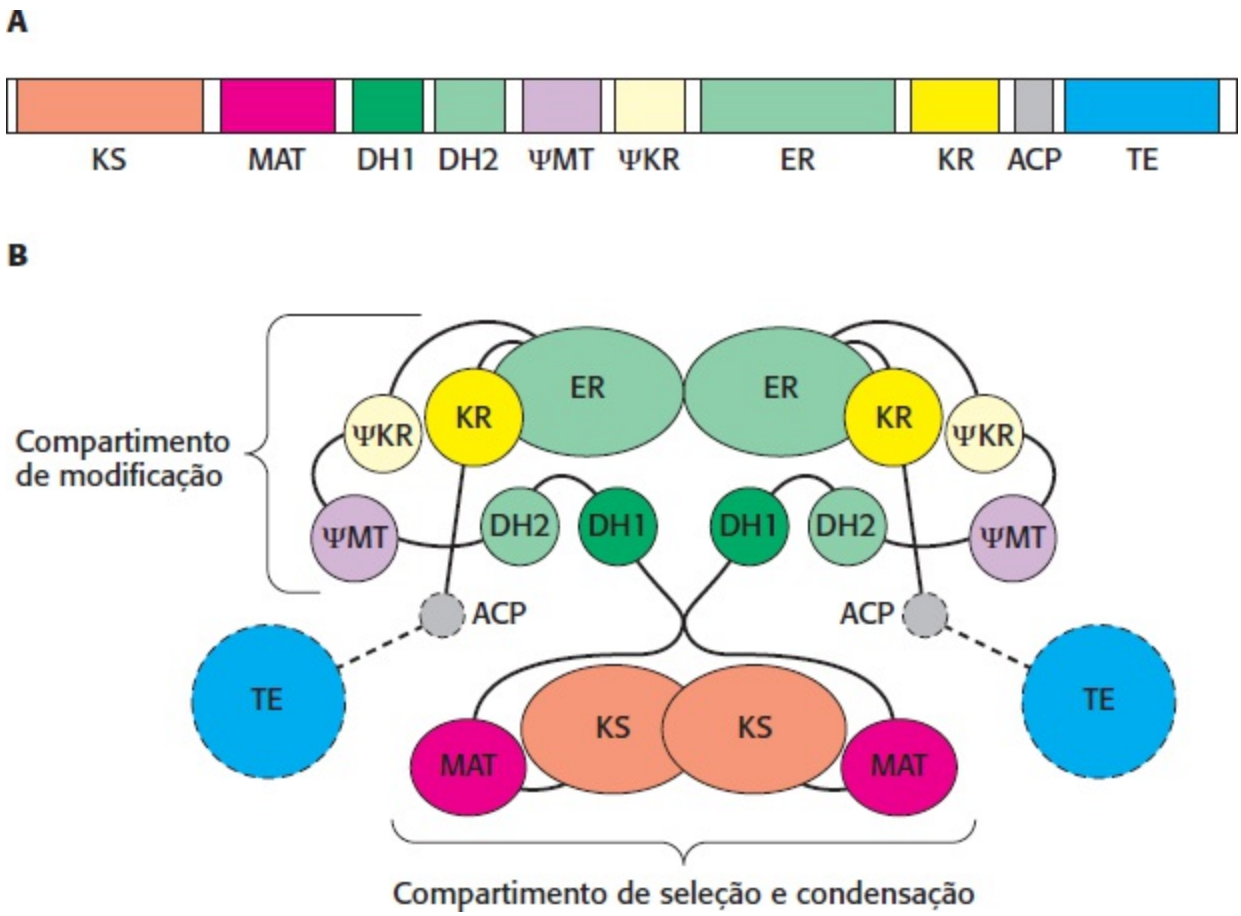


Figura 22.27 Estrutura da ácido graxo sintase de mamíferos. A. O arranjo das atividades catalíticas presentes em uma única cadeia polipeptídica. **B**. Desenho do dímero com base nos resultados da cristalografia de raios X. A ΨMT e a ΨKR são domínios inativos semelhantes às sequências de metiltransferase e ceto redutase. Embora existam dois domínios para a DH, apenas um deles é ativo. Os domínios inativos são representados em cores pálidas. As linhas tracejadas contornam domínios cuja estrutura ainda não foi determinada. Abreviaturas: KS, ceto sintase; MAT, malonil acetil transferase; DH, desidratase; ΨMT, metil transferase (inativa); ΨKR, ceto redutase (inativa); ER, enoil redutase; KR, ceto redutase; ACP, proteína carreadora de acila; TE, tioesterase.

As duas cadeias componentes interagem de modo que as atividades enzimáticas são distribuídas em dois compartimentos distintos (Figura 22.27B). O compartimento de seleção e condensação liga-se aos substratos acetil e malonil e os condensa, formando a cadeia em crescimento. É interessante observar que a ácido graxo sintase de mamíferos apresenta um sítio ativo, a malonil acetil

transacilase, que acrescenta tanto acetil-CoA quanto malonil-CoA. Em contrapartida, a maioria das outras ácido graxo sintases exibe duas atividades enzimáticas separadas, uma para a acetil-CoA e a outra para a malonil-CoA. O compartimento de modificação é responsável pelas atividades de redução e desidratação que resultam no produto ácido graxo saturado.

Consideremos um ciclo catalítico do complexo da ácido graxo sintase (Figura 22.28). O ciclo de alongamento começa quando a metil-acetil transferase (MAT) move uma unidade acetila da coenzima A para a proteína carreadora de acil (ACP). A β-ceto sintase (β-KS) aceita uma unidade acetila, formando um tioéster com um resíduo de cisteína no sítio ativo da β-KS. A ACP desocupara é recarregada pela MAT, desta vez com uma unidade malonil. A malonil ACP chega ao sítio ativo da β-KS, onde ocorre a condensação dos dois fragmentos de 2 carbonos na ACP, com liberação concomitante de CO_2. O processo de seleção e condensação é concluído com a ligação do produto β-cetoacila à ACP.

A ACP carregada passa sequencialmente pelos sítios ativos do compartimento de modificação da enzima, onde o grupo β-ceto do substrato é reduzido a –OH, desidratado e, por fim, reduzido, dando origem ao produto acil saturado, que ainda está ligado à ACP. Com a finalização do processo de modificação, o produto reduzido é transferido para a β-KS, enquanto a ACP aceita outra unidade malonila. Ocorre a condensação, seguida de outros ciclos de modificação. O processo repete-se até a liberação, pela tioesterase, do produto final, o ácido palmítico C_{16}.

Muitos complexos multienzimáticos eucarióticos são proteínas multifuncionais, nos quais diferentes enzimas estão ligadas de modo covalente. Uma vantagem desse arranjo consiste na coordenação na atividade de síntese das diferentes enzimas. Além disso, os intermediários podem ser processados eficientemente de um sítio ativo para outro, sem sair da montagem. Ademais, um complexo de enzimas ligadas de modo covalente é mais estável do que um complexo formado por atrações não covalentes. Cada uma das enzimas componentes é reconhecidamente homóloga a seu equivalente bacteriano. As enzimas multifuncionais, como a ácido graxo sintase, provavelmente surgiram na evolução dos eucariotos por fusão dos genes individuais de ancestrais evolutivos.

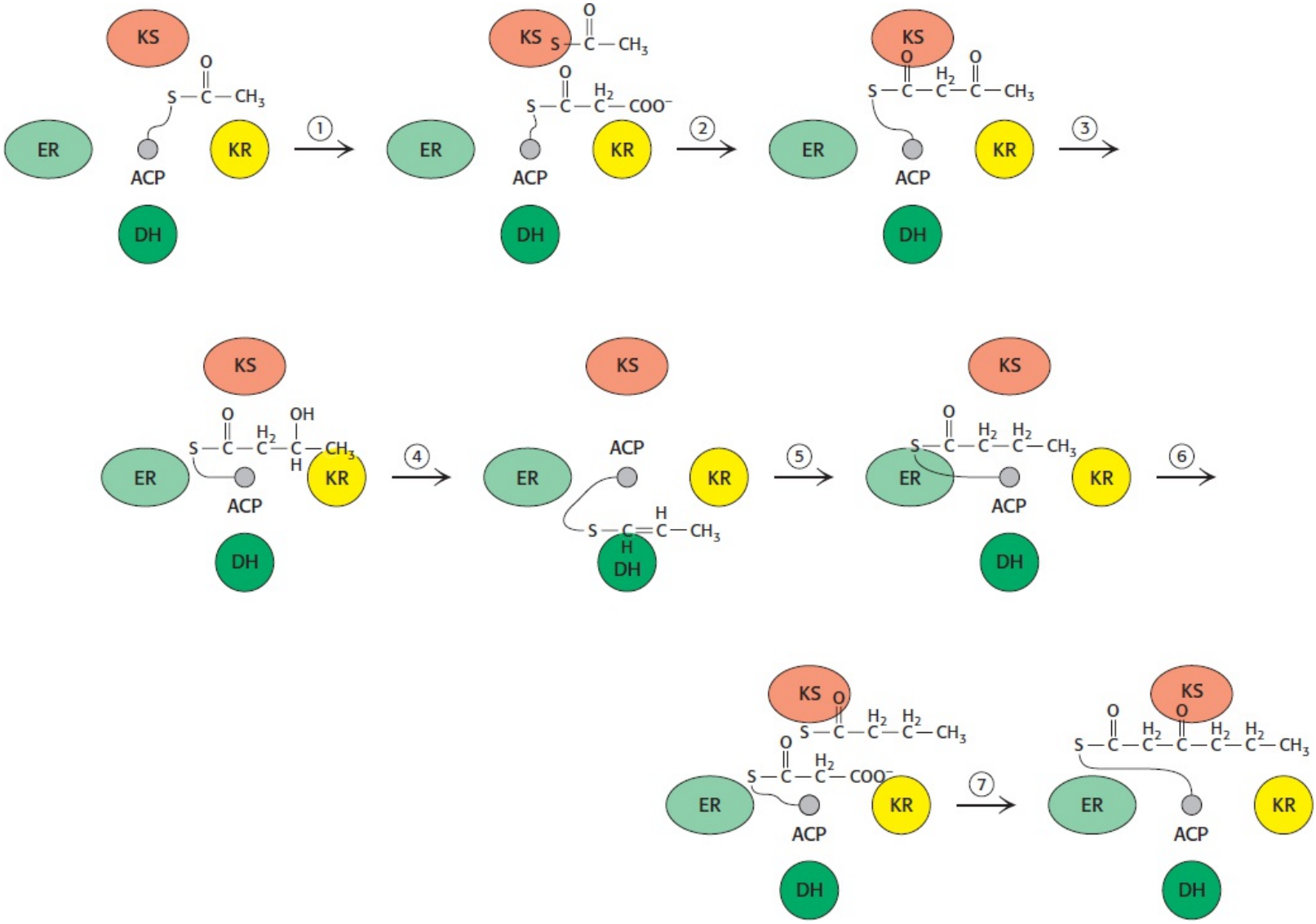


Figura 22.28 Ciclo catalítico da ácido graxo sintase de mamíferos. O ciclo começa quando a MAT (não mostrada) liga uma unidade acetila à ACP. **1.** A ACP transfere a unidade acetila para a KS, e, em seguida, a MAT liga uma unidade malonila à ACP. **2.** A ACP entra novamente em contato com KS, que condensa as unidades acetila e malonila para formar o produto β-ceto acil, ligado à ACP. **3.** A ACP transfere o produto β-ceto acil para a enzima KR, que reduz o grupo ceto a um álcool. **4.** Em seguida, o produto β-hidroxila entra em contato com DH, que introduz uma dupla ligação, com perda de água. **5.** O produto enoil é transferido para a enzima ER, onde a dupla ligação é reduzida. **6.** A ACP entrega o produto reduzido à KS e é recarregada com malonil-CoA pela MAT. **7**. A KS condensa as duas moléculas na ACP, que está pronta para iniciar outro ciclo. Ver abreviaturas na Figura 22.27.

A síntese de palmitato requer 8 moléculas de acetil-CoA, 14 moléculas de NADPH e 7 moléculas de ATP

A estequiometria da síntese de palmitato é

$$\text{Acetil-CoA} + 7\ \text{malonil-CoA} + 14\ \text{NADPH} + 20\ \text{H}^+ \rightarrow \text{palmitato} + 7\ \text{CO}_2 + 14\ \text{NADP}^+ + 8\ \text{CoA} + 6\ \text{H}_2\text{O}$$

A equação para a síntese da malonil-CoA usada na equação anterior é

$$7\ \text{acetil-CoA} + 7\ \text{CO}_2 + 7\ \text{ATP} \rightarrow 7\ \text{malonil-CoA} + 7\ \text{ADP} + 7\ \text{P}_i + 14\ \text{H}^+$$

Por conseguinte, a estequiometria global para a síntese de palmitato é

$$8 \text{ acetil-CoA} + 7 \text{ ATP} + 14 \text{ NADPH} + 6 \text{ H}^+ \rightarrow$$
$$\text{palmitato} + 14 \text{ NADP}^+ + 8 \text{ CoA} + 6 \text{ H}_2\text{O} + 7 \text{ ADP} + 7 \text{ P}_i$$

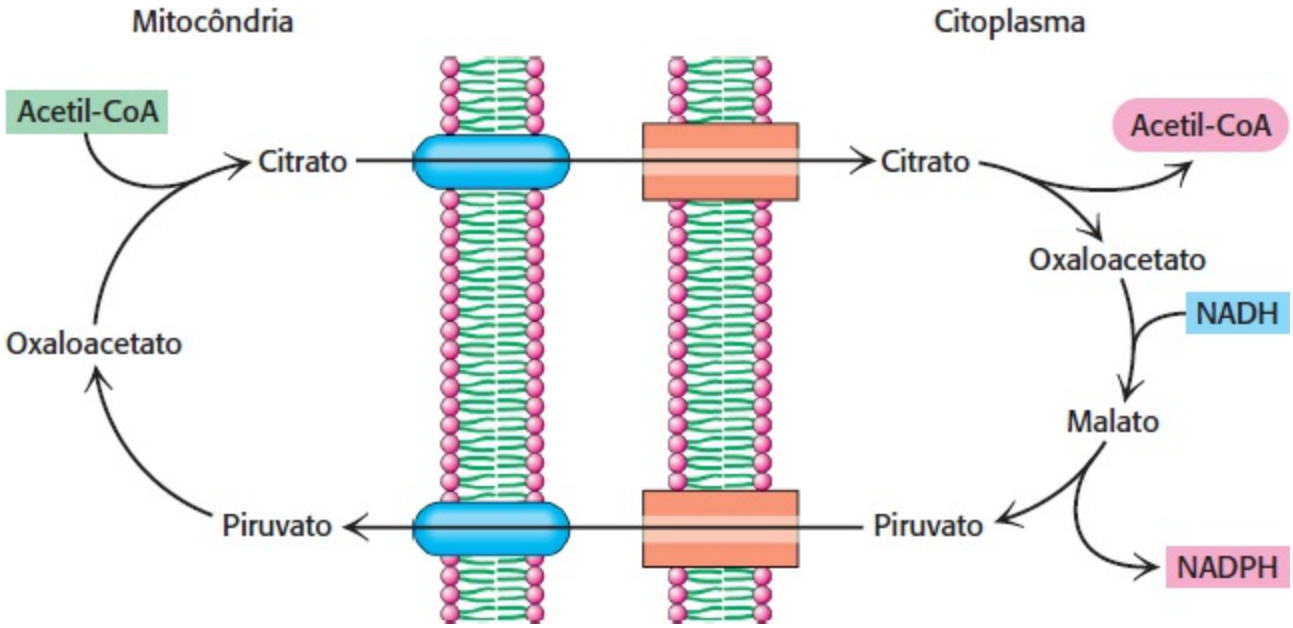


Figura 22.29 Transferência de acetil-CoA para o citoplasma. A acetil-CoA é transferida das mitocôndrias para o citoplasma, e o potencial redutor do NADH é concomitantemente convertido naquele do NADPH por essa série de reações.

O citrato atua como carreador de grupos acetila das mitocôndrias para o citoplasma para a síntese de ácidos graxos

Os ácidos graxos são sintetizados no citoplasma, enquanto a acetil-CoA é formada a partir do piruvato nas mitocôndrias; por conseguinte, a acetil-CoA precisa ser transferida das mitocôndrias para o citoplasma para a síntese de ácidos graxos. Entretanto, as mitocôndrias não são facilmente permeáveis à acetil-CoA. Convém lembrar que a carnitina só transporta ácidos graxos de cadeia longa. *A barreira contra a acetil-CoA é superada pelo citrato, que transporta grupos acetila através da membrana mitocondrial interna.* O citrato é formado na matriz mitocondrial pela condensação de acetil-CoA com oxaloacetato (Figura 22.29). Quando presente em altos níveis, o citrato é transportado para o citoplasma, onde é clivado pela *ATP-citrato liase.*

$$\text{Citrato} + \text{ATP} + \text{CoA} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{acetil-CoA} + \text{ADP} + \text{P}_i + \text{oxaloacetato}$$

Assim a acetil-CoA e o oxaloacetato são transferidos das mitocôndrias para o citoplasma à custa da hidrólise de uma molécula de ATP.

Liases

Enzimas que catalisam a clivagem de ligações C–C, C–O ou C–N por eliminação. Nessas reações forma-se uma dupla ligação.

Diversas fontes fornecem NADPH para a síntese de ácidos graxos

O oxaloacetato formado na transferência de grupos acetila para o citoplasma precisa agora retornar às mitocôndrias. A membrana mitocondrial interna é impermeável ao oxaloacetato. Por conseguinte, é necessária uma série de reações de desvio. O aspecto mais importante é que essas reações

produzem grande parte do NADPH necessário para a síntese dos ácidos graxos. Em primeiro lugar, o oxaloacetato é reduzido a malato pelo NADH. Essa reação é catalisada por uma *malato desidrogenase no citoplasma*.

$$\text{Oxaloacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{malato} + \text{NAD}^+$$

Em segundo lugar, o malato sofre descarboxilação oxidativa por uma *enzima de malato ligada a NADP*$^+$ (também denominada *enzima málica*).

$$\text{Malato} + \text{NADP}^+ \text{ piruvato} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$$

O piruvato formado nessa reação entra prontamente nas mitocôndrias, onde é carboxilado a oxaloacetato pela piruvato carboxilase.

$$\text{Piruvato} + \text{CO}_2 + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{oxaloacetato} + \text{ADP} + \text{P}_i + 2\ \text{H}^+$$

A soma dessas três reações é

$$\text{NADP}^+ + \text{NADH} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADPH} + \text{NAD}^+ + \text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^+$$

Por conseguinte, uma molécula de NADPH e gerada para cada molécula de acetil-CoA que é transferida da mitocôndria para o citoplasma. Assim, são formadas oito moléculas de NADPH, quando oito moléculas de acetil-CoA são transferidas para o citoplasma para a síntese de palmitato. *As outras seis moléculas de NADPH necessárias para esse processo provêm da via das pentoses fosfato* (Seção 20.3).

O acúmulo dos precursores da síntese de ácidos graxos é um exemplo maravilhoso do uso coordenado de múltiplas vias. O ciclo do ácido cítrico, transporta o oxaloacetato das mitocôndrias, e a via das pentoses fosfato fornece os átomos de carbono e o poder redutor, enquanto a glicólise e a fosforilação oxidativa fornecem o ATP para suprir as necessidades para a síntese de ácidos graxos (Figura 22.30).

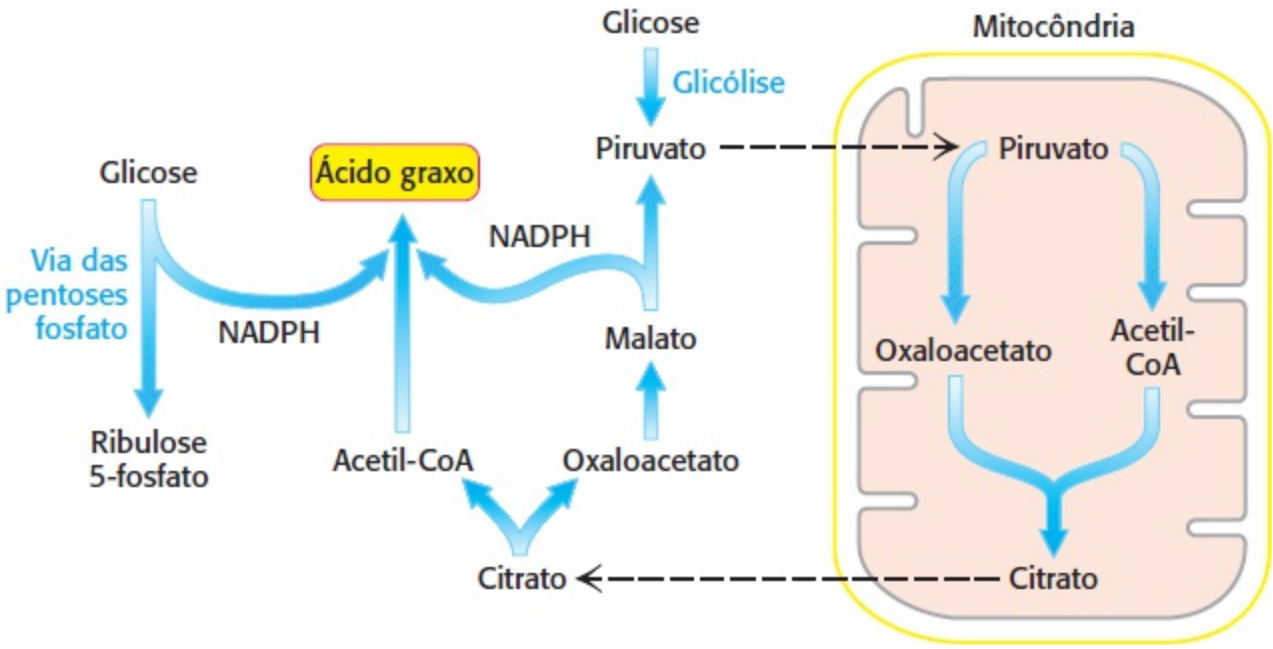


Figura 22.30 Integração das vias: síntese de ácidos graxos. A síntese de ácidos graxos requer a cooperação de diversas vias metabólicas localizadas em diferentes compartimentos celulares.

Os inibidores da ácido graxo sintase podem ser fármacos úteis

A ácido graxo sintase está hiperexpressa na maioria dos tipos de câncer humano, e a sua expressão está correlacionada com a natureza maligna do tumor. Os ácidos graxos não são armazenados como fonte de energia, porém são usados como precursores para a síntese de fosfolipídios, que são então incorporados nas membranas das células cancerosas em rápido crescimento. Pesquisadores intrigados com essa observação testaram inibidores da ácido graxo sintase em camundongos para verificar se os inibidores diminuiriam a velocidade de crescimento do tumor. Com efeito, esses inibidores retardam o crescimento do tumor, aparentemente ao induzir apoptose. Todavia, houve outra observação surpreendente: *os camundongos tratados com inibidores da enzima de condensação apresentaram uma notável perda de peso*, visto que se alimentavam menos. Por conseguinte, os inibidores da ácido graxo sintase são candidatos atraentes como agentes antitumorais e como fármacos contra a obesidade.

22.5 O alongamento e a insaturação de ácidos graxos são efetuados por sistemas enzimáticos acessórios

O principal produto da ácido graxo sintase é o palmitato. Nos eucariotos, os ácidos graxos mais longos são formados por reações de alongamento, catalisadas por enzimas na face citoplasmática da *membrana do retículo endoplasmático*. Essas reações acrescentam sequencialmente unidades de dois carbonos às extremidades carboxila de substratos acil-CoA graxo tanto saturados quanto insaturados. A malonil-CoA é o doador de dois carbonos no alongamento de acil-CoA graxos. Mais uma vez, a condensação é impulsionada pela descarboxilação da malonil-CoA.

Enzimas ligadas à membrana geram ácidos graxos insaturados

Os sistemas do retículo endoplasmático também introduzem duplas ligações nas acil-CoA de cadeia longa. Por exemplo, na conversão de estearil-CoA em oleil-CoA, uma dupla ligação cis-Δ^9 é introduzida por uma oxidase que *emprega oxigênio molecular* e *NADH* (ou *NADPH*).

$$\text{Estearil-CoA} + \text{NADH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{oleil-CoA} + \text{NAD}^+ + 2\ \text{H}_2\text{O}$$

Essa reação é catalisada por um complexo de três proteínas ligadas à membrana: *NADH-citocromo* b_5 *redutase*, *citocromo* b_5 e uma *dessaturase* (Figura 22.31). Em primeiro lugar, elétrons são transferidos do NADH para a fração FAD da NADH-citocromo b_5 redutase. O átomo de ferro do grupo heme do citocromo b_5 é então reduzido ao estado Fe^{2+}. O átomo de ferro não hêmico da dessaturase é subsequentemente convertido ao estado Fe^{2+}, possibilitando a sua interação com O_2 e com o substrato acil-CoA graxo saturado. Forma-se uma dupla ligação, e ocorre a liberação de duas moléculas de H_2O. Dois elétrons provêm do NADH e dois, da ligação simples do substrato de ácido graxo.

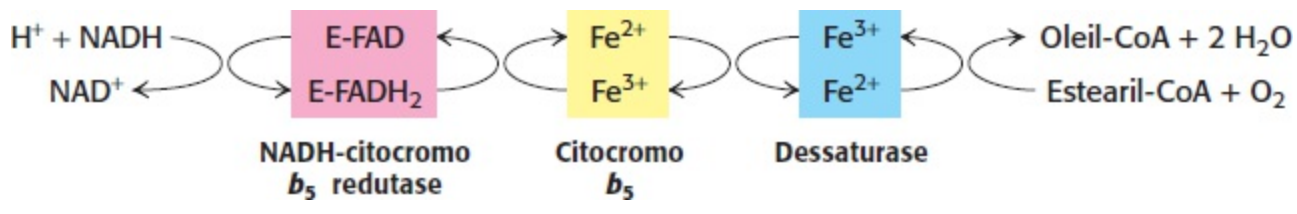


Figura 22.31 Cadeia de transporte de elétrons na dessaturação de ácidos graxos.

Uma variedade de ácidos graxos insaturados pode ser formada a partir do oleato por uma combinação de reações de alongamento e dessaturação. Por exemplo, o oleato pode ser alongado para um ácido graxo 20:1 cis-Δ^{11}. Alternativamente, uma segunda ligação dupla pode ser inserida, produzindo um ácido graxo 18:2 cis-Δ^{6}, Δ^{9}. De modo semelhante, o palmitato (16:0) pode ser oxidado a palmitoleato (16:1 cis-Δ^{9}), que pode ser então alongado a *cis*-vacenato (18:1 cis-Δ^{11}).

Os ácidos graxos insaturados nos mamíferos originam-se do palmitoleato (16:1), do oleato (18:1), do linoleato (18:2) ou linolenato (18:3). O número de átomos de carbono a partir da extremidade de um ácido graxo insaturado derivado até a dupla ligação mais próxima identifica o seu precursor.

Os mamíferos carecem das enzimas necessárias para introduzir duplas ligações em átomos de carbono além do C-9 na cadeia de ácidos graxos. Por conseguinte, os mamíferos são incapazes de sintetizar linoleato (18:2 cis-Δ^{9}, Δ^{12}) e linolenato (18:3 cis-Δ^{9}, Δ^{12}, Δ^{15}). O linoleato e o linolenato são os dois ácidos graxos essenciais. O termo essencial significa que eles precisam ser supridos pela alimentação, visto que são necessários para o organismo e não podem ser sintetizados pelo próprio organismo. O linoleato e o linolenato fornecidos pela alimentação constituem os pontos de partida para a síntese de uma variedade de outros ácidos graxos insaturados.

Precursor	Fórmula
Linolenato (ω-3)	$CH_3—(CH_2)_2=CH–R$
Linoleato (ω-6)	$CH_3—(CH_2)_5=CH–R$
Palmitoleato (ω-7)	$CH_3—(CH_2)_6=CH–R$
Oleato (ω-9)	$CH_3—(CH_2)_7=CH–R$

Os hormônios eicosanoides derivam de ácidos graxos poli-insaturados

O *araquidonato*, um ácido graxo 20:4, derivado do linoleato, constitui o principal precursor de várias classes de moléculas de sinalização: prostaglandinas, prostaciclinas, tromboxanos e leucotrienos (Figura 22.32).

Uma *prostaglandina é um ácido graxo* de 20 carbonos contendo um anel de cinco carbonos (Figura 22.33). Esse composto básico é modificado por redutases e isomerases, produzindo nove classes principais de prostaglandinas designadas como PGA até PGI; um subscrito indica o número de duplas ligações de carbono-carbono fora do anel. As prostaglandinas com duas ligações duplas, como a PGE_2, são derivadas do araquidonato; as outras duas duplas ligações desse precursor são perdidas na formação de um anel de cinco membros. A *prostaciclina* e os *tromboxanos* são compostos relacionados, que surgem de uma prostaglandina nascente. São produzidos pela *prostaciclina sintase* e pela *tromboxano sintase*, respectivamente. De modo alternativo, o araquidonato pode ser convertido em leucotrienos pela ação da *lipo-oxigenase*. Os leucotrienos, encontrados pela primeira vez nos leucócitos, contêm três ligações duplas conjugadas – o que explica o seu nome. As prostaglandinas, a prostaciclina, os tromboxanos e os leucotrienos são denominados eicosanoides (do grego *eikosi*, “vinte”), visto que contêm 20 átomos de carbono.

As prostaglandinas e outros eicosanoides são hormônios locais, pois são de vida curta. Eles alteram as atividades das células nas quais são sintetizados e das células adjacentes por meio de sua ligação a receptores 7TM. Seus efeitos podem variar de um tipo de célula para outro, diferentemente das ações mais uniformes dos hormônios globais, como a insulina e o glucagon. As prostaglandinas estimulam a inflamação, regulam o fluxo sanguíneo a determinados órgãos, controlam o transporte de íons através das membranas, modulam a transmissão sináptica e induzem o sono.

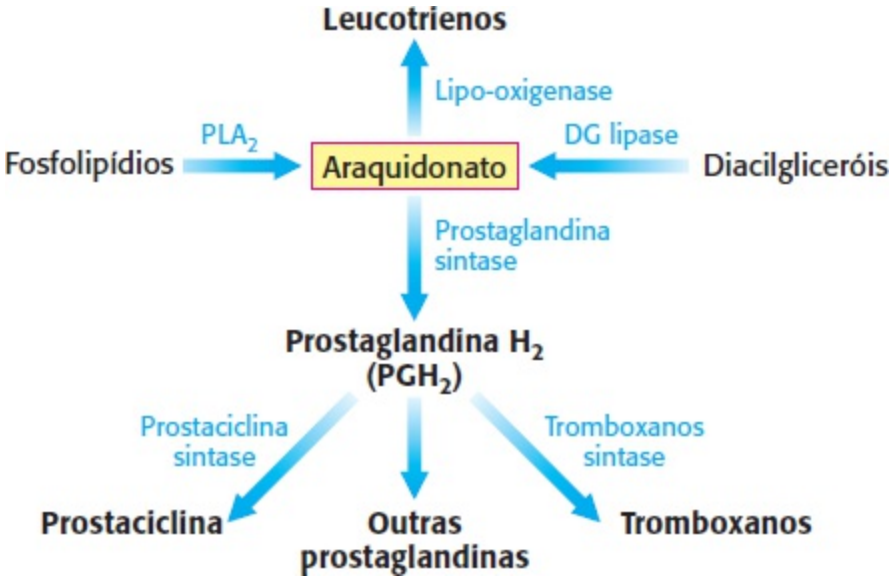


Figura 22.32 O araquidonato é o principal precursor dos hormônios eicosanoides. A prostaglandina sintase catalisa a primeira etapa de uma via que leva às prostaglandinas, prostaciclinas e tromboxanos. A lipo-oxigenase catalisa a etapa inicial em uma via que leva aos leucotrienos.

Convém lembrar que o ácido acetilsalicílico bloqueia o acesso ao sítio ativo da enzima que converte o araquidonato em prostaglandina H_2 (Seção 12.3). Como o araquidonato é o precursor de outras prostaglandinas, da prostaciclina e dos tromboxanos, o bloqueio dessa etapa interfere em muitas vias de sinalização. A capacidade do ácido acetilsalicílico de bloquear essas vias é responsável pelos seus efeitos de amplo espectro sobre a inflamação, a febre, a dor e a coagulação do sangue.

22.6 A acetil-CoA carboxilase desempenha um papel essencial no controle do metabolismo dos ácidos graxos

O metabolismo dos ácidos graxos é rigorosamente controlado, de modo que a síntese e a degradação são altamente responsivas às necessidades fisiológicas. A síntese de ácidos graxos torna-se máxima quando carboidratos e de energia são abundantes e quando há escassez de ácidos graxos. *A acetil-CoA carboxilase desempenha um papel essencial na regulação da síntese e degradação de ácidos graxos*. Convém lembrar que essa enzima catalisa a etapa limitante na síntese de ácidos graxos: a produção de malonil-CoA (o doador ativado de dois carbonos). Essa enzima importante está sujeita à regulação tanto local quanto hormonal. Examinaremos cada um desses níveis de regulação.

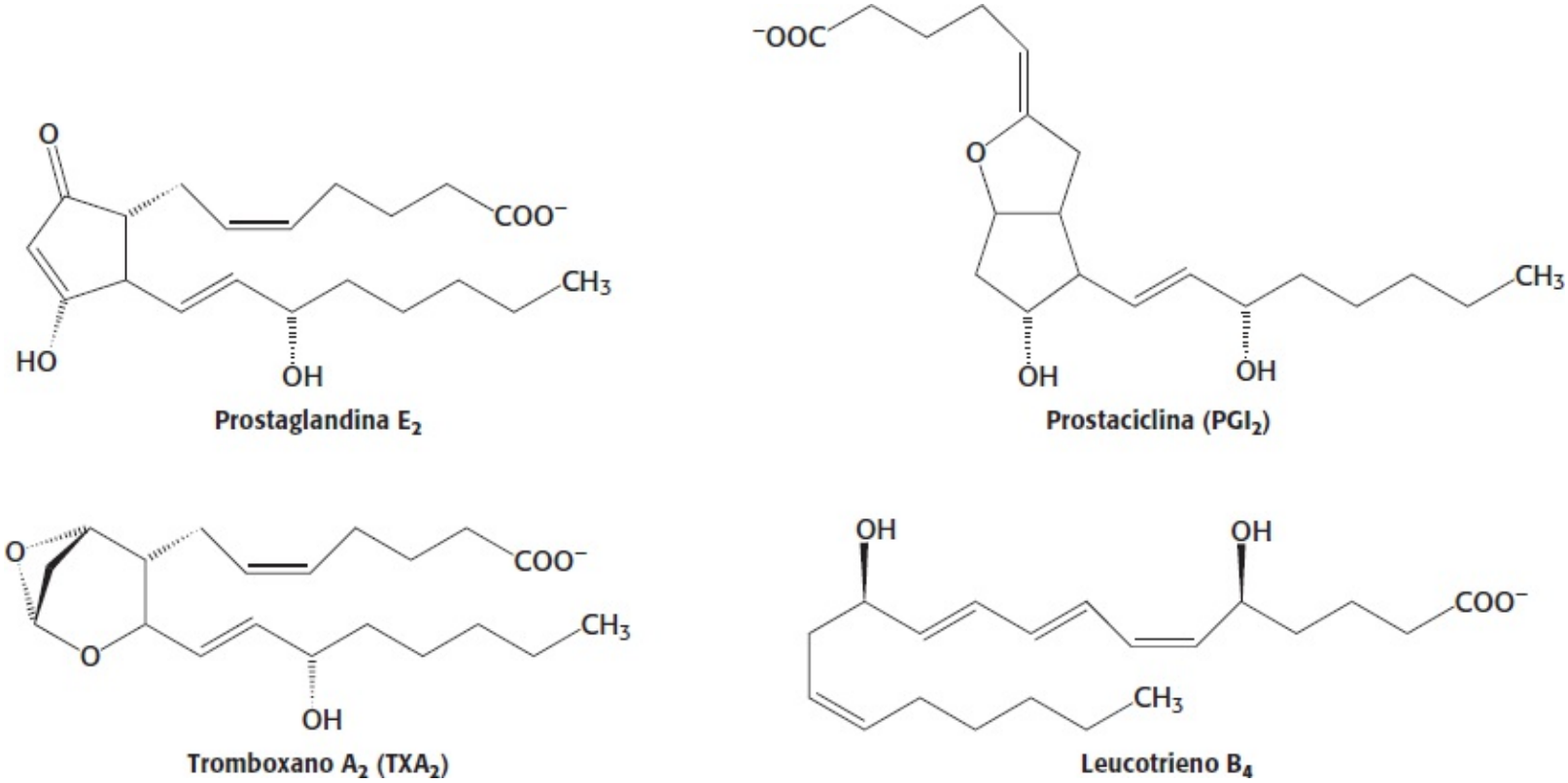


Figura 22.33 Estruturas de vários eicosanoides.

A acetil-CoA carboxilase é regulada por condições da célula

A acetil-CoA carboxilase responde a mudanças em seu ambiente imediato. *A acetil-CoA carboxilase é inativada por fosforilação* e ativada por desfosforilação (Figura 22.34). A *proteína quinase dependente de AMP* (AMPK) converte a carboxilase em uma forma inativa ao modificar três resíduos de serina. A AMPK é essencialmente um medidor de energia; é ativada pelo AMP e inibida pelo ATP. Assim, a carboxilase é inativada quando a carga energética está baixa. Não ocorre síntese de gorduras quando há necessidade de energia.

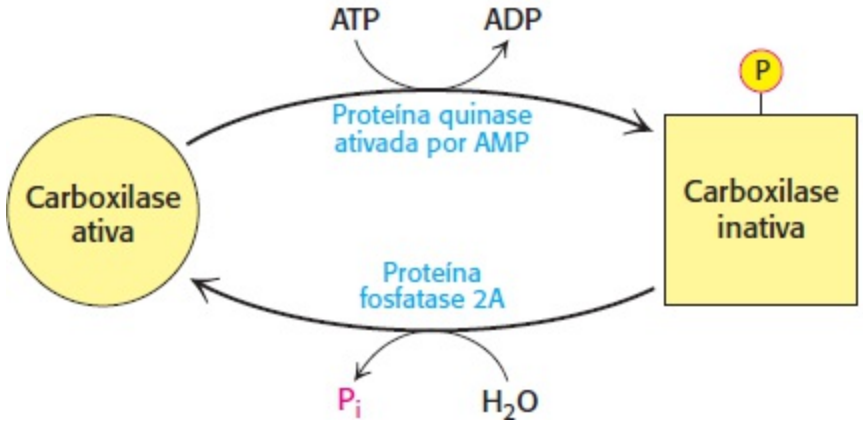


Figura 22.34 Controle da acetil-CoA carboxilase. A acetil-CoA carboxilase é inibida por fosforilação.

A carboxilase também é estimulada alostericamente pelo citrato. O citrato atua de modo incomum sobre a acetil-CoA carboxilase inativa, que ocorre na forma de dímeros inativos isolados. O citrato facilita a polimerização dos dímeros inativos em filamentos ativos (Figura 22.35). A polimerização induzida pelo citrato pode reverter, em parte, a inibição produzida pela fosforilação (Figura 22.36). O nível de citrato está elevado quando a acetil-CoA e o ATP estão presentes em grande quantidade, o

que significa a disponibilidade de matéria-prima e de energia para a síntese de ácidos graxos. O efeito estimulador do citrato sobre a carboxilase é contrabalançado pela *palmitoil-CoA*, que está presente em grande quantidade quando do excesso de ácidos graxos. A palmitoil-CoA induz a dissociação dos filamentos em subunidades inativas. A palmitoil-CoA também inibe a translocase que transporta o citrato das mitocôndrias para o citoplasma, bem como a glicose 6-fosfato desidrogenase, que gera NADPH na via das pentoses fosfato.

A acetil-CoA carboxilase também desempenha um papel na regulação da degradação de ácidos graxos. A malonil-CoA, o produto da reação da carboxilase, está presente em altos níveis quando há muitas moléculas de energia. *A malonil-CoA inibe a carnitina aciltransferase I, impedindo a entrada de acil-CoA graxos na matriz mitocondrial em momentos de abundância.* A malonil-CoA é um inibidor particularmente efetivo da carnitina aciltransferase I no coração e no músculo, tecidos que têm pouca capacidade própria de síntese de ácidos graxos. Nesses tecidos, a acetil-CoA carboxilase pode ser uma enzima puramente reguladora.

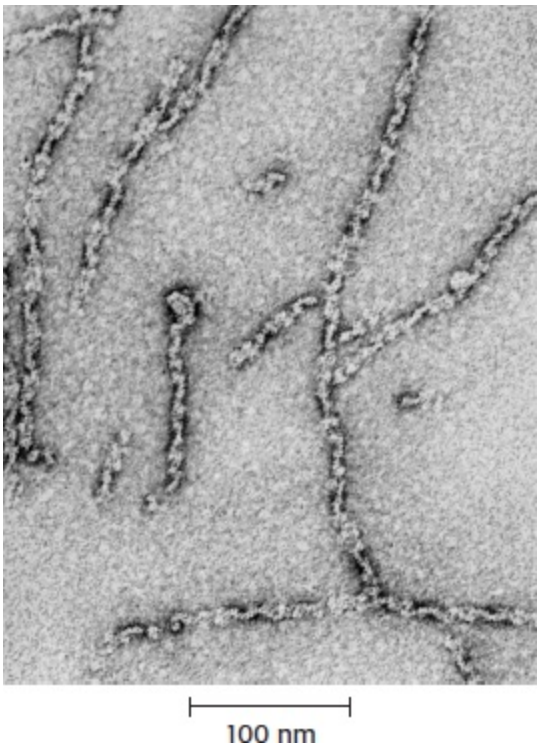


Figura 22.35 Filamentos de acetil-CoA carboxilase. A micrografia eletrônica mostra a forma filamentosa enzimaticamente ativada da acetil-CoA carboxilase de fígado de galinha. A forma inativa é um dímero de subunidades de 265 kDa. [Cortesia do Dr. Daniel Lane.]

A acetil-CoA carboxilase é regulada por uma variedade de hormônios

A acetil-CoA carboxilase é controlada pelos hormônios glucagon, epinefrina e insulina, que refletem o estado global de energia do organismo. *A insulina estimula a síntese de ácidos graxos ao ativar a carboxilase, enquanto o glucagon e a epinefrina têm o efeito inverso.*

Regulação pelo glucagon e pela epinefrina. Consideremos mais uma vez, uma pessoa que acabou de acordar depois de uma noite de sono e começou uma sessão de exercícios. Conforme já mencionado, as reservas de glicogênio estarão baixas, porém os lipídios estarão disponíveis para a mobilização.

Conforme assinalado anteriormente, os hormônios glucagon e epinefrina, que estão presentes em

condições de jejum e exercício físico, estimularão a liberação de ácidos graxos e triacilgliceróis nas células adiposas, os quais serão liberados no sangue, e, provavelmente, seguiram para as células musculares, onde serão utilizados imediatamente como fonte de energia. Esses mesmos hormônios inibirão a síntese de ácidos graxos ao inibir a acetil-CoA carboxilase. Embora não se conheça o mecanismo exato pelo qual esses hormônios exercem seus efeitos, o resultado efetivo consiste em aumentar a inibição pela quinase dependente de AMP. Esse resultado tem sentido fisiológico: quando o nível de energia da célula está baixo, conforme indicado por uma alta concentração de AMP, e o nível de energia do organismo está baixo, conforme indicado pelo glucagon, não ocorre síntese de gorduras. A epinefrina, que sinaliza a necessidade imediata de energia, potencializa esse efeito. Por conseguinte, *esses hormônios catabólicos interrompem a síntese de ácidos graxos ao manter a carboxilase no estado fosforilado inativo.*

Regulação pela insulina. Consideremos agora a situação observada após o término do exercício, e quando o corredor já se alimentou. Neste caso, a insulina inibe a mobilização de ácidos graxos e estimula o seu acúmulo como triacilgliceróis pelo músculo e tecido adiposo. A insulina também estimula a síntese de ácidos graxos ao ativar a acetil-CoA carboxilase. Esse hormônio estimula a carboxilase ao estimular a atividade de uma proteína fosfatase, que desfosforila e ativa a acetil-CoA carboxilase. Por conseguinte, as moléculas de sinalização de glucagon, epinefrina e insulina atuam em conjunto sobre o metabolismo dos triacilgliceróis e sobre a acetil-CoA carboxilase, regulando cuidadosamente a utilização e o armazenamento de ácidos graxos.

Resposta à alimentação. *O controle a longo prazo é mediado por alterações nas velocidades de síntese e de degradação das enzimas que participam na síntese de ácidos graxos.* Animais que permaneceram em jejum e, a seguir, foram alimentados com dieta rica em carboidratos e pobre em lipídios mostraram aumentos acentuados nas quantidades de acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase dentro de poucos dias. Esse tipo de regulação é conhecido como *controle adaptativo*. Essa regulação, que é mediada tanto pela insulina quanto pela glicose, ocorre ao nível da transcrição gênica.

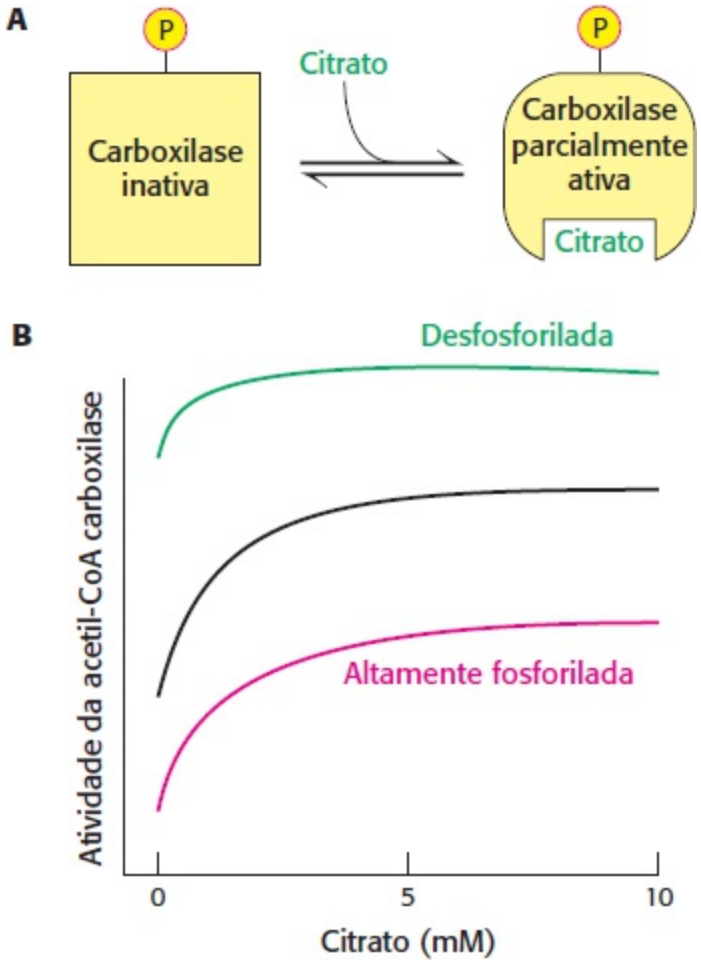


Figura 22.36 Dependência da atividade catalítica da acetil-CoA carboxilase na concentração de citrato. A. O citrato pode ativar, em parte, a carboxilase fosforilada. **B.** A forma desfosforilada da carboxilase é altamente ativa, mesmo quando o citrato está ausente. O citrato supera, em parte, a inibição produzida pela fosforilação [Segundo G. M. Mabrouk, I. M. Helmy, K. G. Thampy e S. J. Wakil. J. Biol. Chem. 265:6330-6338, 1990.]

Resumo

22.1 Os triacilgliceróis são reservas de energia altamente concentradas

Os ácidos graxos são fisiologicamente importantes como (1) moléculas de energia, (2) componentes de fosfolipídios e glicolipídios, (3) modificadores hidrofóbicos de proteínas e (4) hormônios e mensageiro intracelulares. São armazenados no tecido adiposo como triacilgliceróis (gordura neutra).

22.2 A utilização de ácidos graxos como fonte de energia requer três estágios de processamento

Os triacilgliceróis podem ser mobilizados pela ação hidrolítica de lipases que estão sob controle hormonal. O glucagon e a epinefrina estimulam a degradação de triacilgliceróis ao ativarem a lipase. Em contrapartida, a insulina inibe a lipólise. Os ácidos graxos são ativados a acil-CoA, transportados através da membrana mitocondrial interna pela carnitina e degradados na matriz mitocondrial por uma sequência repetitiva de quatro reações: oxidação pelo FAD, hidratação, oxidação pelo NAD^+ e tiólise pela coenzima A. O FADH e o NADH formados nas etapas de oxidação transferem seus elétrons ao O_2 por meio da cadeia respiratória, enquanto a acetil-CoA formada na etapa de tiólise entra normalmente no ciclo do ácido cítrico ao se

condensar com o oxaloacetato. Os mamíferos são incapazes de converter os ácidos graxos em glicose, visto que carecem de uma via para a produção efetiva de oxaloacetato, piruvato ou outros intermediários gliconeogênicos a partir da acetil-CoA.

22.3 Os ácidos graxos insaturados e de cadeia ímpar exigem etapas adicionais para a sua degradação

Os ácidos graxos que contêm duplas ligações ou um número ímpar de átomos de carbono necessitam de etapas auxiliares para a sua degradação. Uma isomerase e uma redutase são necessárias para a oxidação dos ácidos graxos insaturados, enquanto a propionil-CoA derivada de cadeias com número ímpar de átomos de carbono necessita de uma enzima dependente de vitamina B_{12} para ser convertida em succinil-CoA.

22.4 Os ácidos graxos são sintetizados pela ácido graxo sintase

Os ácidos graxos são sintetizados no citoplasma por uma via diferente da β oxidação. A ácido graxo sintase é o complexo enzimático responsável pela síntese de ácidos graxos. A síntese começa com a carboxilação da acetil-CoA a malonil-CoA, a etapa limitante. Essa reação impulsionada pelo ATP é catalisada pela acetil-CoA carboxilase, uma enzima que tem como grupo prostético a biotina. Os intermediários na síntese de ácidos graxos são ligados a uma proteína carreadora de acila. Forma-se acetil ACP a partir da acetil-CoA, e ocorre formação de malonil ACP a partir de malonil-CoA. A acetil ACP e a malonil ACP condensam-se para formar aceto acetil ACP, uma reação impulsionada pela liberação de CO_2 da unidade malonil ativada. Em seguida, ocorrem uma redução, uma desidratação e uma segunda redução. O NADPH é o redutor nessas etapas. A butiril ACP formada dessa maneira está pronta para um segundo ciclo de alongamento, que começa com a adição de uma unidade de dois carbonos da malonil ACP. Sete ciclos de alongamento produzem palmitoil ACP, que é hidrolisada a palmitato. Nos organismos superiores, as enzimas que catalisam a síntese de ácidos graxos são ligadas de modo covalente em um complexo enzimático multifuncional. Um ciclo de reações com base na formação e na clivagem do citrato transporta grupos acetila das mitocôndrias para o citoplasma. O NADPH necessário para a síntese é gerado na transferência de equivalentes redutores das mitocôndrias pela ação combinada da malato desidrogenase citoplasmática e enzima málica e pela via das pentoses fosfato.

22.5 O alongamento e a insaturação de ácidos graxos são efetuados por sistemas enzimáticos acessórios

Os ácidos graxos são alongados e dessaturados por sistemas enzimáticos na membrana do retículo endoplasmático. A dessaturação requer NADH e O_2 e é efetuada por um complexo constituído de uma flavoproteína, um citocromo e uma ferroproteína não hêmica. Os mamíferos carecem das enzimas para introduzir duplas ligações distais ao C-9, de modo que necessitam de linoleato e linolenato em sua alimentação.

O araquidonato, um precursor essencial das prostaglandinas e de outras moléculas de sinalização, deriva do linoleato. Esse ácido graxo poli-insaturado 20:4 é o precursor de várias classes de moléculas sinalizadoras – prostaglandinas, prostaciclinas, tromboxanos e leucotrienos –, que atuam como mensageiros e hormônios locais, em virtude de sua transitoriedade. São denominados eicosanoides, visto que contêm 20 átomos de carbono. O

ácido acetilsalicílico (aspirina), um anti-inflamatório e antitrombótico, bloqueia de modo irreversível a síntese desses eicosanoides.

22.6 A acetil-CoA carboxilase desempenha um papel essencial no controle do metabolismo dos ácidos graxos

A síntese e a degradação dos ácidos graxos são reguladas de modo recíproco, de modo que ambas não estejam simultaneamente ativas. A acetil-CoA carboxilase, o local essencial de controle, é fosforilada e inativada pela quinase dependente de AMP. A fosforilação é revertida por uma proteína fosfatase. O citrato, que sinaliza a abundância de unidades básicas de construção e de energia, reverte parcialmente a inibição por fosforilação. A atividade da carboxilase é estimulada pela insulina e inibida pelo glucagon e pela epinefrina. Em tempos de fartura, as acil-CoA graxos não entram na matriz mitocondrial, visto que a malonil-CoA inibe a carnitina aciltransferase I.

Palavras-chave

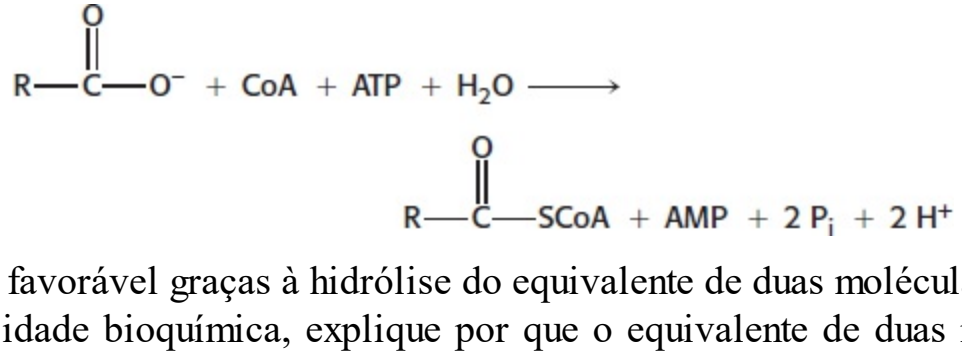
acetil-CoA carboxilase (p. 661)
ácido graxo sintase (p. 661)
acil adenilato (p. 649)
araquidonato (p. 668)
carnitina (p. 649)
corpos cetônicos (p. 657)
eicosanoides (p. 669)
malonil-CoA (p. 661)
peroxissomo (p. 656)
prostaglandina (p. 668)
proteína carreadora de acila (ACP) (p. 661)
proteína quinase dependente de AMP (AMPK) (p. 670)
triacilglicerol (gordura neutra, triglicerídio) (p. 643)
via da β-oxidação (p. 650)
vitamina B_{12} (cobalamina (p. 654)

Questões

1. *Após a lipólise*. Escreva uma equação balanceada para a conversão do glicerol em piruvato. Quais são as enzimas necessárias além daquelas da via glicolítica?

2. *Formas de energia*. As reações parciais que levam à síntese de acil-CoA (equações 1 e 2, p. 649) são livremente reversíveis. A constante de equilíbrio para as somas dessas reações, aproxima-se de 1, o que significa que os níveis de energia dos reagentes e produtos são aproximadamente iguais, embora uma molécula de ATP tenha sido hidrolisada. Explique por que essas reações são prontamente reversíveis.

3. *Taxa de ativação*. A reação para a ativação dos ácidos graxos antes da degradação é



Essa reação é muito favorável graças à hidrólise do equivalente de duas moléculas de ATP. Do ponto de vista de contabilidade bioquímica, explique por que o equivalente de duas moléculas de ATP é utilizado, embora o lado esquerdo da equação tenha apenas uma molécula de ATP.

4. *Sequência correta*. Coloque a seguinte lista de reações ou locais relevantes da β-oxidação dos ácidos graxos na sequência apropriada.

(a) Reação com carnitina

(b) Ácido graxo no citoplasma

(c) Ativação de ácidos graxos pela ligação a CoA

(d) Hidratação

(e) Oxidação ligada a NAD^+

(f) Tiólise

(g) Acil-CoA nas mitocôndrias

(h) Oxidação ligada ao FAD

5. *Lembrança de reações passadas.* Já nos deparamos com reações semelhantes às reações de oxidação, hidratação e oxidação da degradação de ácidos graxos em nosso estudo de bioquímica. Que outra via utiliza esse conjunto de reações?

6. *Uma acetil-CoA fantasma?* Na equação da degradação de ácidos graxos apresentada, são necessárias apenas sete moléculas de CoA para produzir oito moléculas de acetil-CoA. Como essa diferença é possível?

$$\text{Palmitoil-CoA} + 7\ \text{FAD} + 7\ \text{NAD}^+ + 7\ \text{CoASH} + 7\ \text{H}_2\text{O} \rightarrow 8\ \text{Acetil-CoA} + 7\ \text{FADH}_2 + 7\ \text{NADH} + 7\ \text{H}^+$$

7. *Comparando os rendimentos*. Compare o rendimento de ATP do ácido palmítico e do ácido palmitoleico.

8. *Contando os ATP 1.* Qual a produção de ATP na oxidação completa do ácido graxo C_{17} (heptadecanoico)? Suponha que a propionil-CoA produza finalmente oxaloacetato no ciclo do ácido cítrico.

9. *Doce tentação.* O ácido esteárico é um ácido graxo C_{18} componente do chocolate. Suponha que você teve um dia depressivo e decidiu devorar um chocolate para aliviar o problema. Quantos ATP você obteria com a oxidação completa do ácido esteárico a CO_2?

10. *A melhor forma de armazenamento*. Compare a produção de ATP da oxidação completa da

glicose, um carboidrato de seis carbonos, e do ácido hexanoico, um ácido graxo de seis carbonos. O ácido hexanoico é também denominado ácido capricoico e é responsável pelo "aroma" das cabras. Por que as gorduras são maiores fontes de energia do que os carboidratos?

11. *De ácidos graxos a corpos cetônicos.* Escreva uma equação balanceada para a conversão do estearato em acetoacetato.

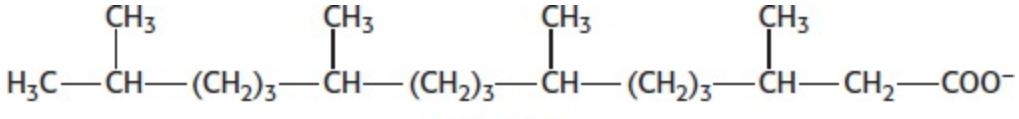
12. *Generoso, mas nem tanto*. O fígado constitui o principal local de síntese de corpos cetônicos. Entretanto, os corpos cetônicos não são utilizados pelo fígado, e sim são liberados para uso por outros tecidos. O fígado ganha energia no processo de síntese e liberação dos corpos cetônicos. Calcule o número de moléculas de ATP produzidas pelo fígado na conversão do palmitato, um ácido graxo C_{16}, em acetoacetato.

13. *Contando os ATP 2.* Quanta energia se obtém com a oxidação completa do corpo cetônico D-3-hidroxibutirato?

14. *Outro ponto de vista*. Por que se poderia argumentar que a resposta à questão 13 está errada?

15. *Um adágio acurado.* Um antigo adágio químico é de que as gorduras queimam na chama dos carboidratos. Qual é a base molecular desse adágio?

16. *Doença de Refsum.* O ácido fitânico é um componente de ácido graxo de cadeia ramificada da clorofila e também um componente importante do leite. Nos indivíduos suscetíveis, pode ocorrer acúmulo de ácido fitânico, resultando em problemas neurológicos. Essa síndrome é denominada doença de Refsum ou doença de armazenamento de ácido fitânico.



Ácido fitânico

(a) Por que o ácido fitânico se acumula?

(b) Que atividade enzimática você poderia inventar para evitar o seu acúmulo?

17. *Uma dieta quente*. O trítio é um isótopo radioativo do hidrogênio, que pode ser prontamente detectado. Um ácido graxo saturado de seis carbonos totalmente marcado com trítio é administrado a um rato, e uma biopsia muscular do animal é efetuada por técnicos assistentes interessados, cuidadosos e discretos. Esses assistentes isolam cuidadosamente toda a acetil-CoA obtida da β-oxidação do ácido graxo radioativo e removem a CoA para formar acetato. Qual será a razão global entre trítio e carbono do acetato isolado?

18. *Encontrando triacilgliceróis sempre nos lugares errados.* O diabetes melito insulinodependente é frequentemente acompanhado de altos níveis de triacilgliceróis no sangue. Sugira uma explicação bioquímica.

19. *Contraponto*. Compare e contraste os seguintes aspectos da oxidação e da síntese de ácidos graxos

(a) localização do processo.

(b) carreador de acila.

(c) redutores e oxidantes.

(d) estereoquímica dos intermediários.

(e) direção da síntese e da degradação.

(f) organização do sistema enzimático.

20. *Uma síntese flexível.* O miristato, um ácido graxo saturado C_{14}, é usado como emoliente para cosméticos e preparações medicinais tópicas. Escreva uma equação balanceada para a síntese do miristato.

21. *O custo da limpeza*. O ácido láurico é um ácido graxo de 12 carbonos, sem nenhuma dupla ligação. O sal sódico do ácido láurico (laurato de sódio) é um detergente comum empregado em uma variedade de produtos, incluindo detergente para lavagem de roupa, xampus e pasta de dente. Quantas moléculas de ATP e NADPH são necessárias para a síntese do ácido láurico?

22. *Organização*. Organize as seguintes etapas da síntese de ácidos graxos na sua sequência correta.

(a) Desidratação

(b) Condensação

(c) Liberação de um ácido graxo C_{16}

(d) Redução de um grupo carbonila

(e) Formação de malonil ACP

23. *Sem acesso a recursos.* Qual seria o efeito sobre a síntese de ácidos graxos de uma mutação da ATP-citrato liase que reduzisse a atividade da enzima? Explique.

24. *Nada mais que a verdade*. Indique se verdadeiro ou falso. Se for falso, explique.

(a) A biotina é necessária para a atividade da ácido graxo sintase.

(b) A reação de condensação na síntese de ácidos graxos é acionada pela descarboxilação da malonil-CoA.

(c) A síntese de ácidos graxos não depende de ATP.

(d) O palmitato é o produto final da ácido graxo sintase.

(e) Todas as atividades enzimáticas necessárias para a síntese de ácidos graxos nos mamíferos estão contidas em uma única cadeia polipeptídica.

(f) Nos mamíferos, a ácido graxo sintase é ativa na forma de monômero.

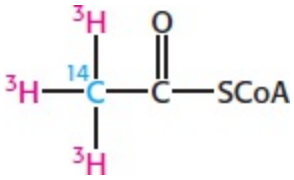
(g) O ácido graxo araquidonato é um precursor de moléculas de sinalização.

(h) A acetil-CoA carboxilase é inibida pelo citrato.

25. *Gordura ímpar.* Sugira como os ácidos graxos com número ímpar de carbonos são sintetizados.

26. *Marcadores*. Suponha que você tem um sistema de síntese de ácidos graxos *in vitro* que contém todas as enzimas e os cofatores necessários para a síntese dos ácidos graxos, exceto a acetil-CoA.

Para esse sistema, você acrescenta acetil-CoA que contém hidrogênio radioativo (^3H, trítio) e carbono 14 (^{14}C), conforme mostrado aqui.



A razão $^3H/^{14}C$ é de 3. Qual seria a razão $^3H/^{14}C$ após a síntese de ácido palmítico (C_{16}) sem o uso da acetil-CoA radioativa?

27. *Abraço apertado*. A avidina, uma glicoproteína encontrada em ovos, apresenta alta afinidade pela biotina. A avidina pode ligar-se à biotina e impedir o seu uso pelo corpo. Como uma alimentação rica em ovos crus poderia afetar a síntese de ácidos graxos? Qual será o efeito de uma alimentação rica em ovos cozidos sobre a síntese de ácidos graxos? Explique.

28. *Alfa ou ômega?* Apenas uma molécula de acetil-CoA é utilizada diretamente na síntese de ácidos graxos. Identifique os átomos de carbono no ácido palmítico que foram doados pela acetil-CoA.

29. *Ora se vê, ora não*. Embora o HCO_3^- seja necessário para a síntese de ácidos graxos, o seu átomo de carbono não aparece no produto. Explique como essa omissão é possível.

30. *É tudo questão de comunicação*. Por que o citrato é um inibidor apropriado da fosfofrutoquinase?

31. *Rastreando átomos de carbono*. Considere um extrato celular que sintetiza ativamente palmitato. Suponha que uma ácido graxo sintase nessa separação forme uma molécula de palmitato em cerca de 5 min. Uma grande quantidade de malonil-CoA marcada com ^{14}C em cada átomo de carbono da unidade malonil é acrescentada de repente a esse sistema, e a síntese de ácidos graxos é interrompida um minuto depois por alteração do pH. Os ácidos graxos são analisados quanto à sua radioatividade. Qual é o átomo de carbono do palmitato formado por esse sistema mais radioativo – C-1 ou C-14?

32. *Um mutante inaceitável*. Os resíduo de serina na acetil-CoA carboxilase alvo da proteína quinase dependente de AMP é mutado para alanina. Qual é a provável consequência dessa mutação?

33. *Fontes*. Para cada um dos seguintes ácidos graxos insaturados, indique se o precursor de biossíntese nos animais é o palmitoleato, o oleato, o linoleato ou o linolenato.

(a) 18:1 cis-Δ^{11}

(b) 18:3 cis-Δ^6, Δ^9, Δ^{12}

(c) 20:2 cis-Δ^{11}, Δ^{14}

(d) 20:3 cis-Δ^5, Δ^8, Δ^{11}

(e) 22:1 cis-Δ^{13}

(f) 22:6 cis-Δ^4, Δ^7, Δ^{10}, Δ^{13}, Δ^{16}, Δ^{19}

34. *Impulsionada pela descarboxilação*. Qual é o papel da descarboxilação na síntese de ácidos graxos? Cite outra reação-chave em uma via metabólica que empregue esse tipo de mecanismo.

35. *Excesso de quinase*. Suponha que uma mutação no promotor leve à superprodução de proteína quinase A nas células adiposas. Como o metabolismo de ácidos graxos poderia ser alterado por essa mutação?

36. *Bens bloqueados*. A presença de uma molécula energética no citoplasma não assegura que ela possa ser efetivamente usada. Cite dois exemplos de como o transporte prejudicado de metabólitos entre compartimentos causa doença.

37. *Inversão elegante*. Os peroxissomos apresentam uma via alternativa para a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados. Eles contêm uma hidratase, que converte a D-3-hidroxiacil-CoA em trans-Δ^2-enoil CoA. Como essa enzima pode ser utilizada para oxidar-CoA contendo uma dupla ligação cis em um átomo de carbono par (p.ex., a dupla ligação cis-Δ^{12} do linoleato)?

38. *Catástrofe covalente*. Qual a potencial desvantagem de haver muitos sítios catalíticos reunidos em uma cadeia polipeptídica muito longa?

39. *Ausência de acil-CoA desidrogenases*. Foram descritas várias deficiências genéticas das acil-CoA desidrogenases. Essa deficiência surge no início da vida, depois de um período de jejum. Os sintomas consistem em vômitos, letargia e, algumas vezes, coma. Não apenas os níveis de glicemia estão baixos (hipoglicemia), mas também a cetose induzida por jejum prolongado está ausente. Forneça uma explicação bioquímica para essas últimas duas observações.

40. *Efeitos do clofibrato*. A presença de níveis elevados de triacilgliceróis no sangue está associada a ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais. O clofibrato, um fármaco que aumenta a atividade dos peroxissomos, é algumas vezes utilizado no tratamento de pacientes com essa condição. Qual é a base bioquímica desse tratamento?

41. *Um tipo diferente de enzima*. A Figura 22.36 mostra a resposta da acetil-CoA carboxilase a quantidades variáveis de citrato. Explique esse efeito à luz dos efeitos alostéricos que o citrato tem sobre a enzima. Preveja os efeitos de concentrações crescentes de palmitoil-CoA.

Questões sobre mecanismo

42. *Variação sobre um tema*. A tiolase tem uma estrutura homóloga à da enzima de condensação. Com base nessa observação, proponha um mecanismo para a clivagem da 3-cetoacil-CoA pela CoA.

43. *Dois mais três são quatro*. Proponha um mecanismo de reação para a condensação de uma unidade acetila com a uma unidade malonila para formar uma unidade acetoacetila na síntese de ácidos graxos.

Questões | Integração de capítulos

44. *Dieta mal recomendada*. Suponha que, por alguma razão bizarra, você decidiu viver com uma dieta exclusiva de gorduras de baleia e de foca.

(a) Como a ausência de carboidratos poderia afetar a sua capacidade de utilizar as gorduras?

(b) Como deverá ser o odor de sua respiração?

(c) Um de seus melhores amigos, após tentar sem sucesso convencê-lo a abandonar essa dieta, fez

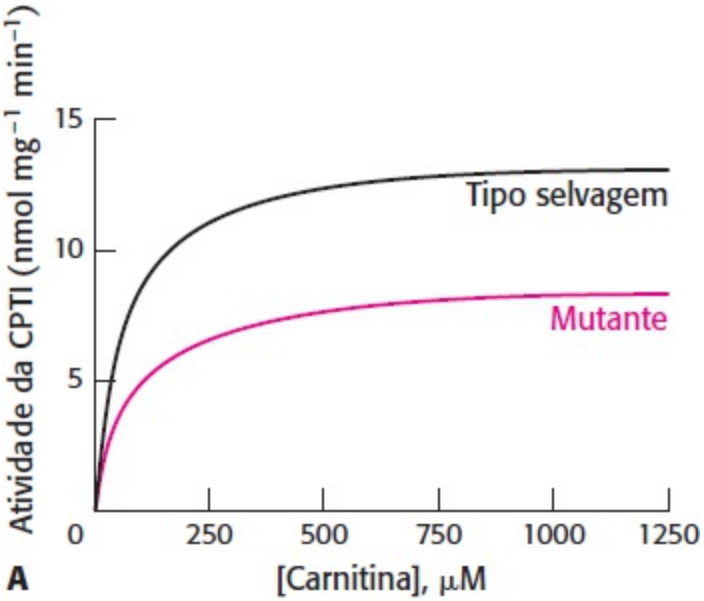
com que prometesse que consumiria uma dose saudável de ácidos graxos de cadeia ímpar. Seu amigo deseja o melhor para você? Explique.

45. *Gorduras em glicogênio*. Um animal é alimentado com ácido esteárico que é marcado com carbono radioativo [^{14}C]. Uma biopsia hepática revela a presença de glicogênio marcado com ^{14}C. Como esse achado é possível considerando que os animais não são capazes de converter gorduras em carboidratos?

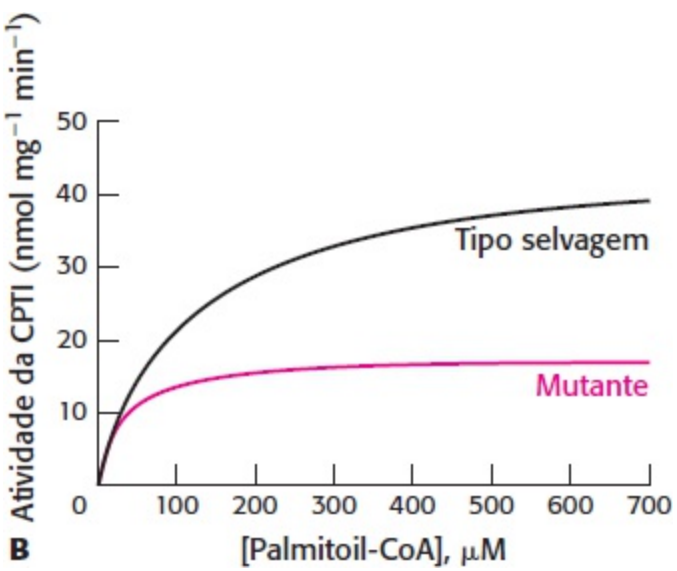
Questões | Interpretação de dados

46. *Enzima mutante*. A carnitina palmitoil transferase I (CPTI) catalisa a conversão de acil-CoA de cadeia longa em acil carnitina, um pré-requisito para transporte para dentro das mitocôndrias e degradação subsequente. Foi construída uma enzima mutante com alteração de um único aminoácido na posição 3, de ácido glutâmico para a alanina. Os Gráficos A a C mostram os dados de estudos realizados para identificar o efeito da mutação [dados de J. Shi, H. Zhu, D. N. Arvidson e G. J. Woldegiorgis. *J. Biol. Chem*. 274:9421-9426, 1999].

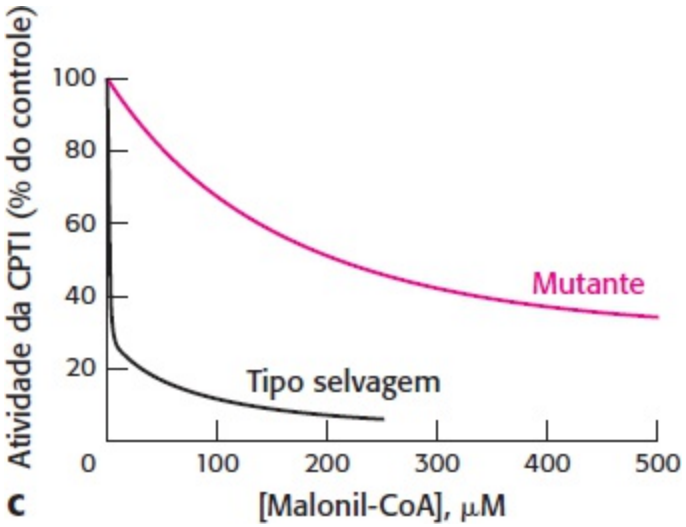
(a) Qual é o efeito da mutação sobre a atividade enzimática quando a concentração de carnitina é variada (Gráfico A)? Quais são os valores de K_M e $V_{máx.}$ para as enzimas de tipo selvagem e mutante?



(b) O que acontece quando o experimento é repetido com concentrações variadas de palmitoil-CoA (Gráfico B)? Quais são os valores de K_M e $V_{máx.}$ para as enzimas de tipo selvagem e mutante?

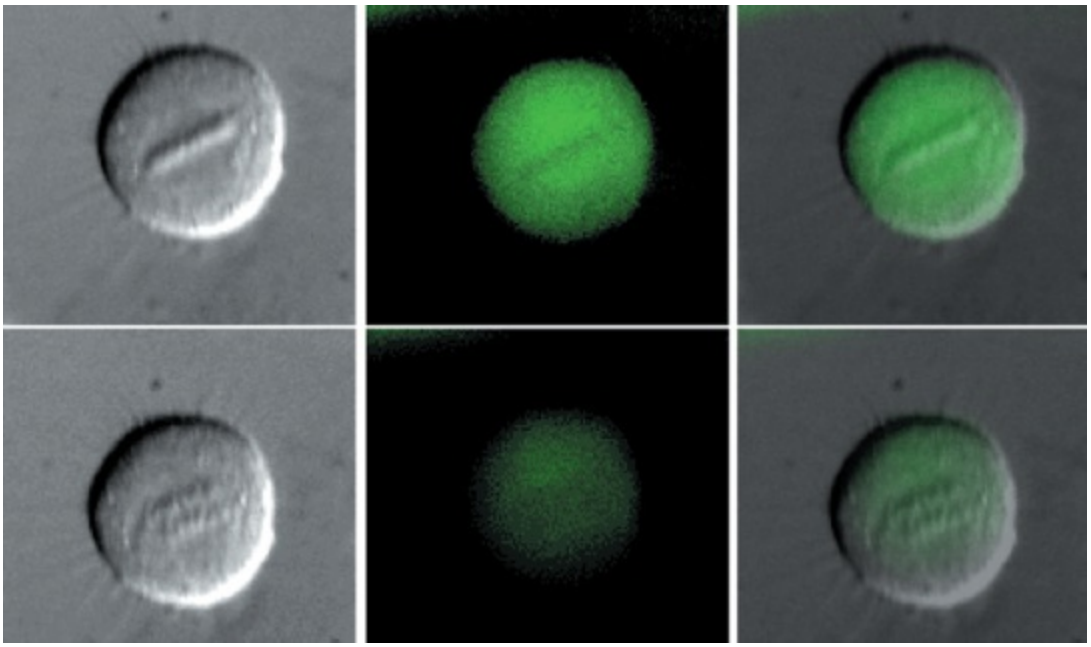


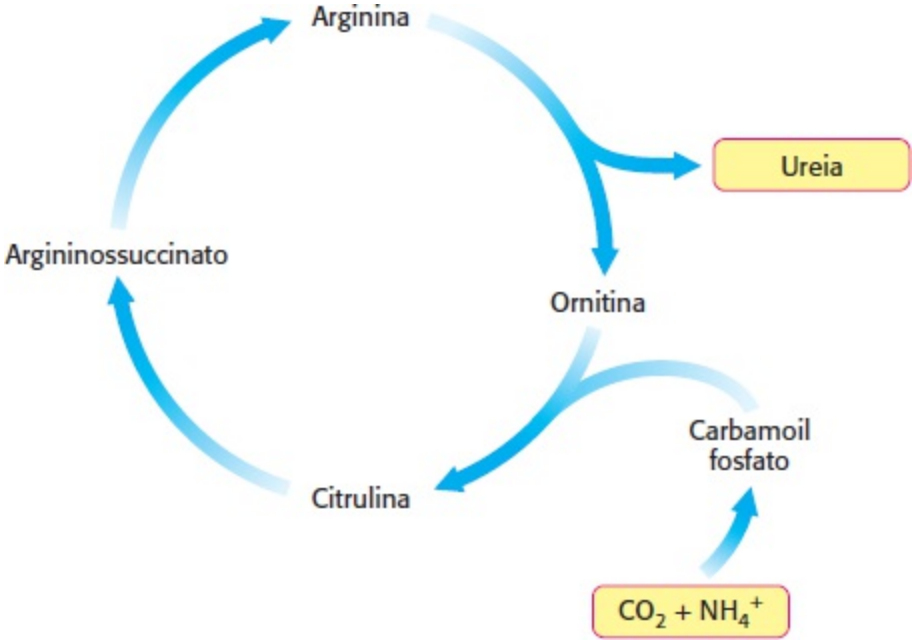
(c) O Gráfico C mostra o efeito inibitório da malonil-CoA sobre as enzimas de tipo selvagem e mutante. Qual a enzima mais sensível à inibição pela malonil-CoA?



(d) Suponha que a concentração de palmitoil-CoA = 100 μM, da carnitina = 100 μM, e da malonil-CoA = 510 μM. Nessas condições, qual o efeito mais proeminente da mutação sobre as propriedades da enzima?

(e) O que você pode concluir acerca do papel do glutamato 3 na função da carnitina aciltransferase I?





Degradação da ciclina B. Essa proteína importante na regulação do ciclo celular é visível como áreas verdes nas imagens apresentadas (a proteína foi fusionada à proteína fluorescente verde). A ciclina B é proeminente durante a metáfase (painéis superiores), porém é degradada na anáfase (painéis inferiores) para impedir o início prematuro de outro ciclo celular. Um grande complexo de proteases, denominado proteassoma, digere a proteína a peptídios, que são então degradados a aminoácidos. Esses aminoácidos são mais tarde reutilizados ou processados, de modo que os esqueletos de carbono possam ser usados como fonte de energia ou como unidades básicas de construção. O grupo amino liberado é convertido em ureia para excreção pelo ciclo da ureia. [À esquerda, cortesia do Dr. Jonathan Pines, University of Cambridge, Wellcome/CRC Institute of Cancer and Developmental Biology.]

SUMÁRIO

23.1 As proteínas são degradadas a aminoácidos

23.2 A renovação das proteínas é rigorosamente regulada

23.3 A primeira etapa na degradação dos aminoácidos consiste na remoção do nitrogênio

23.4 O íon amônio é convertido em ureia na maioria dos vertebrados terrestres

23.5 Os átomos de carbono dos aminoácidos degradados emergem como intermediários metabólicos importantes

23.6 Os erros inatos do metabolismo podem comprometer a degradação dos aminoácidos

A digestão das proteínas alimentares no intestino e a sua degradação intracelular fornecem um suprimento constante de aminoácidos para a célula. Muitas proteínas celulares sofrem degradação constante e são novamente sintetizadas em resposta a mudanças nas demandas metabólicas. Outras não são enoveladas corretamente ou tornam-se danificadas e também precisam ser degradadas. As proteínas desnecessárias ou danificadas são marcadas para destruição pela ligação covalente de cadeias de uma pequena proteína, denominada *ubiquitina*, e, em seguida, são degradadas por um grande complexo dependente de ATP, denominado *proteassoma*. *Os aminoácidos fornecidos pela degradação ou pela digestão são principalmente usados como unidades básicas de construção para a síntese de proteínas ou de outros compostos nitrogenados, como as bases nucleotídicas.*

Os aminoácidos em excesso daqueles necessários para os processos de biossíntese não podem ser nem armazenados, em contraste com ácidos graxos e a glicose, nem excretados. Com efeito, os aminoácidos em excesso são usados como fonte de energia metabólica. *O grupo α-amino é removido, e o esqueleto de carbono resultante é convertido em algum intermediário metabólico principal.* Os grupos amino obtidos dos aminoácidos em excesso são convertidos, em sua maior parte, em ureia, pelo *ciclo da ureia*, e seus esqueletos de carbono são transformados em acetil-CoA, acetoacetil-CoA, piruvato ou em um dos intermediários do ciclo do ácido cítrico. Os esqueletos de carbono são convertidos em glicose, glicogênio e gorduras.

Várias coenzimas desempenham papéis essenciais na degradação dos aminoácidos; a mais importante delas é o piridoxal fosfato. Essa coenzima forma intermediários de base de Schiff, que constituem um tipo de aldimina, e possibilitam, assim, a transferência de grupos α-amino entre aminoácidos e cetoácidos. Analisaremos vários erros genéticos de degradação de aminoácidos que causam lesão cerebral e retardo mental a menos que uma ação corretiva seja iniciada logo após o nascimento. A *fenilcetonúria*, que é causada por um bloqueio na conversão da fenilalanina em tirosina, é prontamente diagnosticada e pode ser tratada mediante remoção da fenilalanina da alimentação. O estudo do metabolismo dos aminoácidos é particularmente gratificante, visto que é rico em conexões entre a bioquímica básica e a medicina clínica.

Tabela 23.1 **Aminoácidos essenciais nos seres humanos.**

Histidina	
Isoleucina	

Leucina	
Lisina	
Metionina	
Fenilalanina	
Treonina	
Triptofano	
Valina	

23.1 As proteínas são degradadas a aminoácidos

A proteína alimentar constitui uma fonte vital de aminoácidos. As proteínas particularmente importantes da alimentação são as que contêm aminoácidos essenciais, isto é aminoácidos que não podem ser sintetizados e que precisam ser adquiridos na alimentação (Tabela 23.1). As proteínas ingeridas na alimentação são digeridas a aminoácidos ou pequenos peptídios, que podem ser absorvidos pelo intestino e transportados no sangue. Outra fonte importante de aminoácidos é a degradação das proteínas celulares.

A digestão das proteínas alimentares começa no estômago e termina no intestino

A digestão das proteínas alimentares começa no estômago, onde o ambiente ácido favorece a desnaturação de proteínas em espirais desordenadas e aleatórias. As proteínas desnaturadas são mais acessíveis como substratos para proteólise do que as proteínas nativas. A principal enzima proteolítica do estômago é a pepsina, uma protease inespecífica que, notavelmente, tem atividade máxima em pH 2. Por conseguinte, a pepsina pode atuar no ambiente altamente ácido do estômago que inativa outras proteínas.

A degradação das proteínas prossegue no lúmen do intestino. O pâncreas secreta uma variedade de enzimas proteolíticas no lúmen intestinal na forma de zimogênios inativos, que são então convertidos em enzimas ativas (Seções 9.1 e 10.4). A bateria de enzimas exibe um amplo repertório de especificidades, de modo que os substratos são degradados a aminoácidos livres, bem como a di e tripeptídios. A digestão é ainda mais potencializada por enzimas proteolíticas, como a aminopeptidase N, que estão localizadas na membrana plasmática das células intestinais. As aminopeptidases digerem proteínas a partir da extremidade aminoterminal. Os aminoácidos isolados, bem como os di e tripeptídios, são transportados do lúmen para as células intestinais e, subsequentemente, são liberados no sangue para absorção por outros tecidos (Figura 23.1).

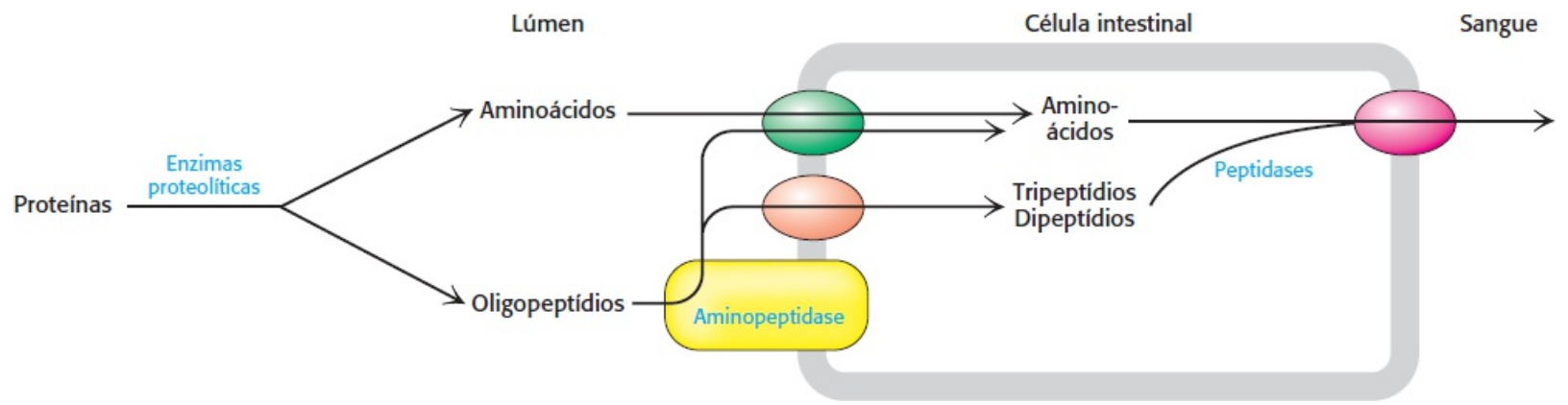


Figura 23.1 Digestão e absorção de proteínas. A digestão das proteínas resulta principalmente da atividade de enzimas secretadas pelo pâncreas. As aminopeptidases associadas ao epitélio intestinal digerem ainda mais as proteínas. Os aminoácidos e os di e tripeptídios são absorvidos pelas células intestinas por transportadores específicos. Os aminoácidos livres são então liberados no sangue para uso por outros tecidos.

As proteínas celulares são degradadas a diferentes velocidades

A renovação das proteínas – isto é, a degradação e a ressíntese de proteínas – ocorre constantemente nas células. Embora algumas proteínas sejam muito estáveis, muitas têm vida curta, particularmente as que participam na regulação metabólica. Essas proteínas podem ser rapidamente degradadas para ativar ou desativar uma via de sinalização. Além disso, as células precisam eliminar proteínas danificadas. Uma proporção significativa de proteínas recém-sintetizadas é defeituosa, devido a erros de tradução ou de enovelamento. Mesmo as proteínas que são normais quando inicialmente sintetizadas podem sofrer lesão oxidativa ou podem ser alteradas de outras maneiras com o passar do tempo. Essas proteínas precisam ser removidas antes que se acumulem e se agreguem. Com efeito, diversas condições patológicas, como certas formas de doença de Parkinson e doença de Huntington estão associadas à agregacão de proteínas.

As meias-vidas das proteínas variam em várias ordens de magnitude. A ornitina descarboxilase, com aproximadamente 11 min, tem uma das meias-vidas mais curtas entre todas as proteínas de mamíferos. Essa enzima participa na síntese de poliaminas, que são cátions celulares essenciais para o crescimento e a diferenciação. Por outro lado, a vida da hemoglobina é limitada apenas pelo tempo de sobrevida do eritrócito, e a proteína da lente, a cristalina, é determinada pelo tempo de vida do organismo.

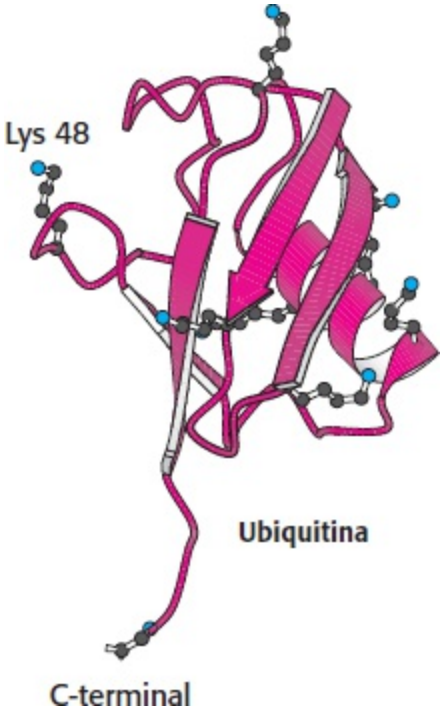


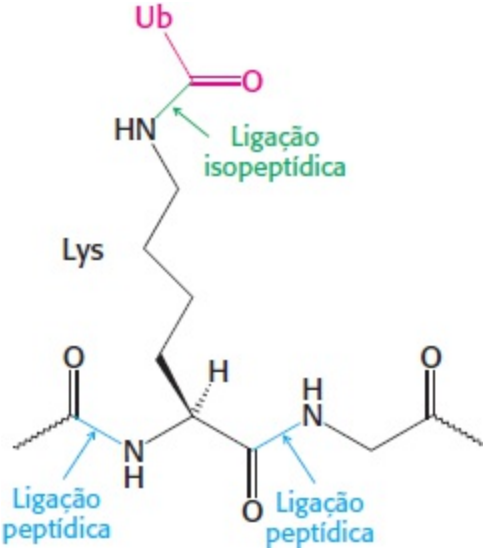
Figura 23.2 Estrutura da ubiquitina. *Observe* que a ubiquitina tem uma extremidade carboxiterminal distendida, que é ativada e ligada a proteínas marcadas para destruição. Os resíduos de lisina, incluindo a lisina 48, o principal sítio de ligação de moléculas adicionais de ubiquitina, são mostrados em modelos de esfera e bastão. [Desenhada a partir de 1 UBI.pdb.]

23.2 A renovação das proteínas é rigorosamente regulada

Como uma célula é capaz de distinguir proteínas que devem ser degradadas? A ubiquitina (Ub), uma pequena proteína (8,5 kDa) presente em todas as células eucarióticas, é um identificador que marca proteínas para destruição (Figura 23.2). A ubiquitina é o equivalente celular da "mancha negra" da *Ilha do Tesouro,* de Robert Louis Stevenson: o sinal da morte.

A ubiquitina marca as proteínas para destruição

A ubiquitina é altamente conservada nos eucariotos: a ubiquitina de levedura e a dos seres humanos diferem em apenas 3 dos 76 resíduos. O resíduo de glicina carboxiterminal da ubiquitina liga-se de modo covalente aos grupos ε-amino de vários resíduos de lisina na proteína destinada à degradação. A energia necessária para a formação dessas *ligações isopeptídicas* (*iso* porque são os grupos ε-amino, e não α-amino, que são marcados) provém da hidrólise do ATP.



Três enzimas participam na fixação da ubiquitina a uma proteína (Figura 23.3): a enzima ativadora de ubiquitina, ou E1; a enzima de conjugação da ubiquitina, ou E2; e a ubiquitina-proteína ligase, ou E3. Em primeiro lugar, o grupo carboxilato da extremidade C-terminal da ubiquitina é ligado a um grupo sulfidrila da E1 por uma ligação tioéster. Essa reação, que é impulsionada pelo ATP, lembra a ativação dos ácidos graxos (Seção 22.2). Nessa reação, o ATP liga-se ao carboxilato C-terminal da ubiquitina, com liberação de pirofosfato, e a ubiquitina é transferida a um grupo sulfidrila de um resíduo de cisteína essencial em E1. Em seguida, a ubiquitina ativada é transferida a um grupo sulfidrila da E2, em uma reação catalisada pela própria E2. Por fim, a E3 catalisa a transferência da ubiquitina de E2 para um grupo ε-amino na proteína-alvo.

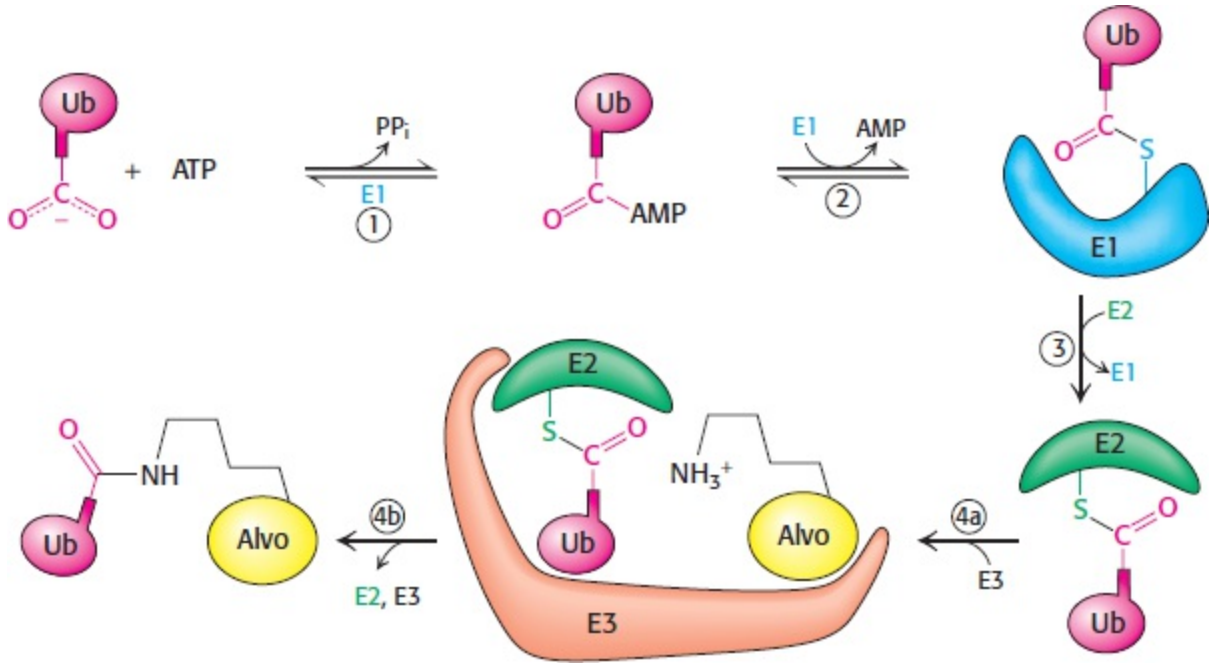


Figura 23.3 Conjugação da ubiquitina. A enzima ativadora de ubiquitina E1 adenila a ubiquitina (Ub) (**1**) e a transfere para um de seus próprios resíduos de cisteína (**2**). Em seguida, a ubiquitina é transferida a um resíduo de cisteína na enzima de conjugação de ubiquitina E2 pela enzima E2 (**3**). Por fim, a ubiquitina-proteína ligase E3 transfere a ubiquitina a um resíduo de lisina na proteína-alvo (4ª e 4b).

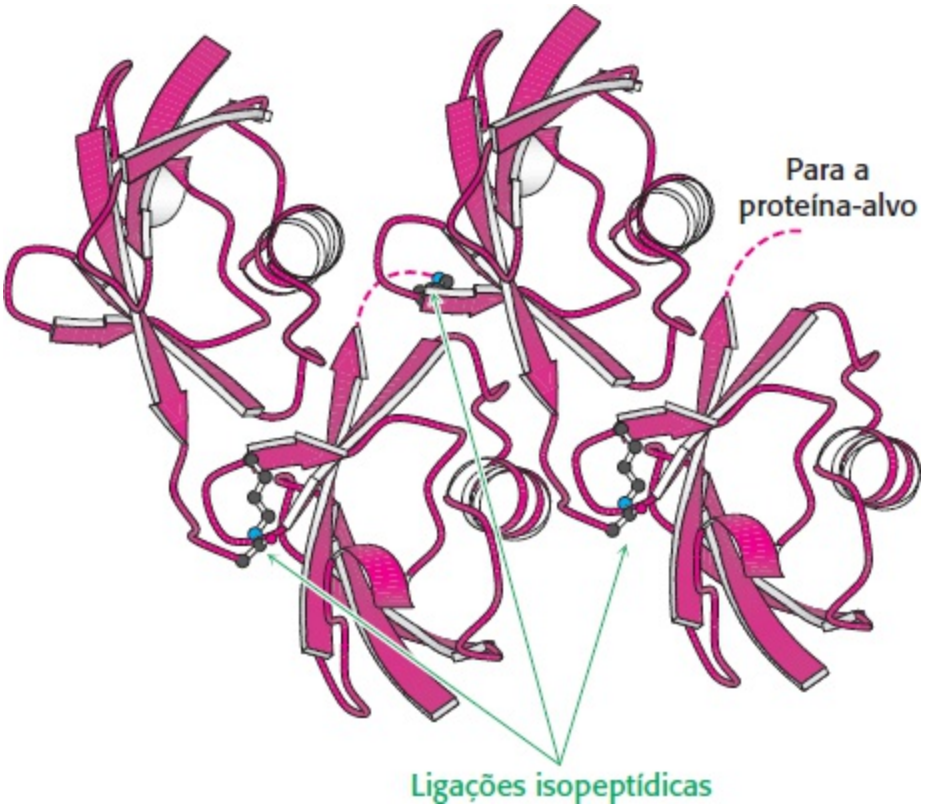


Figura 23.4 Estrutura da tetraubiquitina. Quatro moléculas de ubiquitina são unidas por ligações isopeptídicas. *Observe* que cada ligação isoisopeptídica é formada pela ligação do grupo carboxilato na extremidade C-terminal distendida com o grupo ε-amino de um resíduo de lisina. As linhas tracejadas indicam as posições da extremidade C-terminal distendida que não foram observadas na estrutura cristalina. Essa unidade constitui o principal sinal para a ligação quando ligada a uma proteína-alvo. [Desenhada de 1 TBE. pdb.]

Uma cadeia de quatro ou mais moléculas de ubiquitina é particularmente efetiva na sinalização da necessidade de degradação (Figura 23.4). A reação de ubiquitinação é processiva: a E3 permanece ligada às proteínas-alvo e produz uma cadeia de moléculas de ubiquitina pela ligação do grupo ε-amino do resíduo de lisina 48 de uma molécula de ubiquitina ao carboxilato terminal da outra.

O que determina se uma proteína é ubiquitinada? Uma sequência específica de aminoácidos, denominada *degron*, indica que uma proteína deve ser degradada. Esse tipo de sinal demonstrou ser inesperadamente simples. *A meia-vida de uma proteína citoplasmática é determinada, em grande parte, pelo seu resíduo aminoterminal* (Tabela 23.2). Essa dependência é designada como regra *N-terminal* ou *N-terminal degron*. Uma proteína de levedura com metionina na extremidade N-terminal tipicamente tem uma meia-vida de mais de 20 h, enquanto uma proteína com arginina nessa posição apresenta uma meia-vida com cerca de 2 min. Um resíduo N-terminal altamente desestabilizador, como a arginina ou a leucina, favorece a rápida ubiquitinação, enquanto um resíduo estabilizador, como a metionina ou a prolina, não tem esse efeito. Outros *degrons* que supostamente são capazes de identificar proteínas para degradação incluem *caixas de destruição das ciclinas*, que são sequências de aminoácidos que marcam proteínas do ciclo celular para destruição, e *sequências de PEST*, que contêm a sequência de aminoácidos prolina (P, abreviatura com uma letra), ácido glutâmico (E), serina (S) e treonina (T).

As enzimas E3 são as que fazem a leitura dos resíduos N-terminais. Embora a maioria dos eucariotos tenha apenas uma enzima E1 ou um pequeno número de enzimas E1 distintas, todos os eucariotos apresentam numerosas enzimas E2 e E3 distintas. Além disso, parece existir apenas uma única família de proteínas E2 relacionadas do ponto de vista evolutivo, porém três famílias distintas

de proteínas E3, constituindo um total de centenas de membros. Com efeito, a família E3 é uma das maiores famílias de genes nos seres humanos. A diversidade de proteínas-alvo que devem ser marcadas para destruição exige uma grande quantidade de proteínas E3 como leitoras.

Tabela 23.2 Dependência das meias-vidas das proteínas citoplasmáticas de levedura em relação à identidade de seus resíduos aminoterminais.

Resíduos altamente estabilizadores ($t_{1/2}$ >20 h)			
Ala	Cis	Gli	Met
Pro	Ser	Tre ou Thr	Val
Resíduos intrinsecamente desestabilizadores ($t_{1/2}$ = 2 a 30 min)			
Arg	His	Ile	Leu
Lis	Fen	Trp	Tir
Resíduos desestabilizadores após modificação química ($t_{1/2}$ = 3 a 30 min)			
Asn	Asp	Gln	Glu

Fonte: J. W. Tobias, T. E. Schrader, G. Rocap, and A. Varshavsky. *Science* 254(1991):1374-1377.

Três exemplos demonstram a importância das proteínas E3 para a função celular normal. As proteínas que não são degradadas devido a um defeito da E3 podem acumular-se, produzindo uma doença de agregação proteica, como a doença de Parkinson juvenil ou de início precoce. Um defeito em outro membro da família E3 provoca a síndrome de Angelman, um distúrbio neurológico grave caracterizado por retardo mental, ausência de fala, movimento incoordenado e hiperatividade. Por outro lado, a renovação descontrolada de proteínas também pode produzir condições patológicas perigosas. Por exemplo, o papilomavírus humano (HPV) codifica uma proteína que ativa uma enzima E3 específica. A enzima efetua a ubiquitinação do supressor tumoral p53 e de outras proteínas que controlam o reparo do DNA, que são então destruídas. A ativação dessa enzima E3 é observada em mais de 90% dos carcinomas de colo do útero. Por conseguinte, a marcação inapropriada de proteínas reguladoras essenciais para destruição pode desencadear eventos subsequentes que levam à formação de tumores.

É importante assinalar que o papel desempenhado pela ubiquitina é muito mais amplo do que a simples marcação de proteínas para destruição. Embora o foco tenha sido a degradação proteica, a ubiquitinação também regula proteinases envolvidas no reparo do DNA, na remodelagem da cromatina e na ativação de proteína quinases, entre outros processos bioquímicos.

O proteassoma digere as proteínas marcadas com ubiquitina

Se a ubiquitina é a marca da morte, quem é o executor? *Um grande complexo de protease, denominado proteassoma ou proteassoma 26S, digere as proteínas ubiquitinadas.* Essa protease de múltiplas subunidades, impulsionada pelo ATP, preserva a ubiquitina, que é então reciclada. O proteassoma 26S é um complexo de dois componentes: uma unidade catalítica 20S e uma unidade

regulatória 19S.

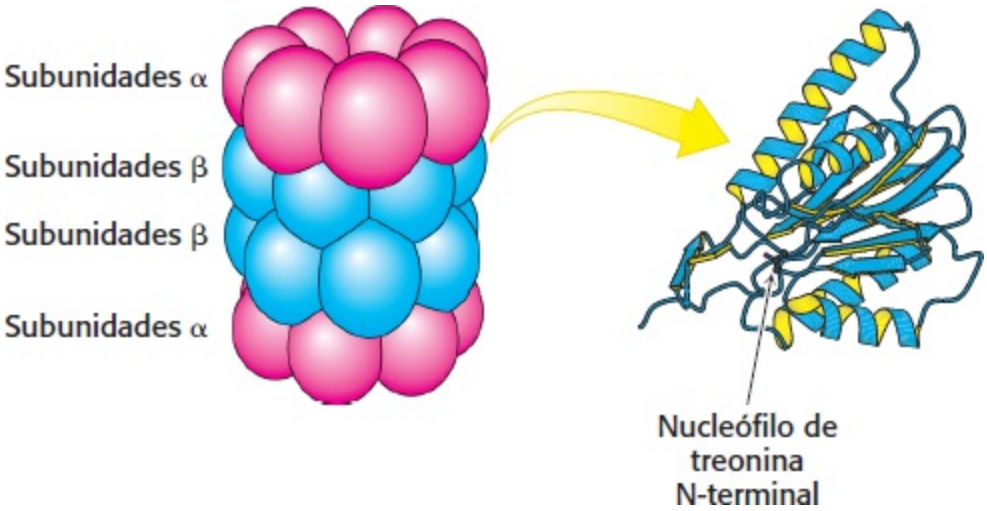


Figura 23.5 Proteassoma 20S. O proteassoma 20S compreende 28 subunidades homólogas (α, vermelho; β, azul), dispostas em quatro anéis de sete subunidades cada um. Algumas das subunidades β (à direita) incluem sítios ativos de protease nas extremidades aminoterminais. [Desenhada a partir de 1RYP.pdb.]

A unidade 20S é constituída de 14 cópias, cada uma de duas subunidades homólogas (α e β), e apresenta uma massa de 700 kDa (Figura 23.5). As subunidades estão dispostas em quatro anéis de sete subunidades, que estão empilhadas formando uma estrutura semelhante a um barril. Os dois anéis externos do barril são constituídos de subunidades α, e os dois anéis internos, de subunidades β. O cerne catalítico 20S é um barril fechado. *O acesso a seu interior é controlado por uma unidade regulatória 19S,* ela própria constituída por um complexo de 700 kDa formado de 20 subunidades. Dois desses complexos 19S ligam-se ao cerne do proteassoma 20S, um em cada extremidade, formando o proteassoma completo 26S (Figura 23.6). A unidade regulatória 19S desempenha três funções. Em primeiro lugar, a unidade 19S liga-se especificamente a cadeias de poliubiquitina, assegurando, assim, que apenas as proteínas ubiquitinadas sejam degradadas. Em segundo lugar, uma isopeptidase na unidade 19S cliva moléculas intactas de ubiquitina das proteínas, de modo que possam ser novamente utilizadas. Por fim, a proteína condenada é desenovelada e direcionada para o cerne catalítico. Os componentes essenciais do complexo 19S consistem em seis ATPases da denominada classe AAA (*A*TPases *a*ssociadas a várias *a*tividades celulares). A hidrólise do ATP ajuda o complexo 19S a desenovelar o substrato e a induzir mudanças conformacionais no cerne catalítico 20S, de modo que o substrato possa ser introduzido no centro do complexo.

Os sítios ativos proteolíticos são sequestrados no interior do barril para proteger substratos potenciais até que sejam direcionados para dentro do barril. Existem três tipos de sítios ativos nas subunidades β, cada um deles exibindo uma especificidade diferente, porém todos empregando uma treonina N-terminal. O grupo hidroxila do resíduo de treonina é convertido em um nucleófilo que ataca os grupos carbonila das ligações peptídicas, formando intermediários acil-enzima. Os substratos são degradados de modo processivo, sem a liberação de intermediários de degradação, até que o substrato seja reduzido a peptídios, cujo tamanho varia de sete a nove resíduos. Esses produtos peptídicos são liberados do proteassoma e depois degradados por outras proteases celulares, produzindo aminoácidos individuais. Por conseguinte, a via de ubiquitinação e o proteassoma cooperam para degradar as proteínas indesejáveis. A Figura 23.7 apresenta uma visão geral dos destinos dos aminoácidos após digestão pelo proteassoma.

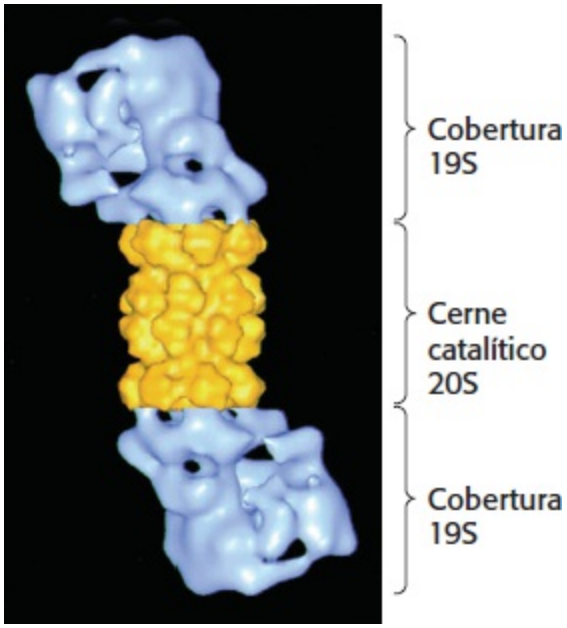


Figura 23.6 Proteassoma 26S. Uma "tampa" 19S está fixada a cada extremidade da unidade catalítica 20S. [De W. Baumeister, J. Walz, F. Zuhl, e E. Seemuller. *Cell* 92 (1998):367-380; cortesia do Dr. Wolfgang Baumeister.]

A via da ubiquitina e o proteassoma têm equivalentes procarióticos

Tanto a via da ubiquitina quanto o proteassoma parecem estar presentes em todos os eucariotos. São também encontrados homólogos do proteassoma em alguns procariotos. Os proteassomas de alguns *archaea* são muito semelhantes, em sua estrutura global, a seus equivalentes eucarióticos e também apresentam 28 subunidades (Figura 23.8). Todavia, no proteassoma de *archaea*, todas as subunidades α dos anéis externos e todas as subunidades β dos anéis internos são idênticas; nos eucariotos, cada subunidade α ou β é uma de sete isoformas diferentes. Essa especialização proporciona uma especificidade distinta de substrato.

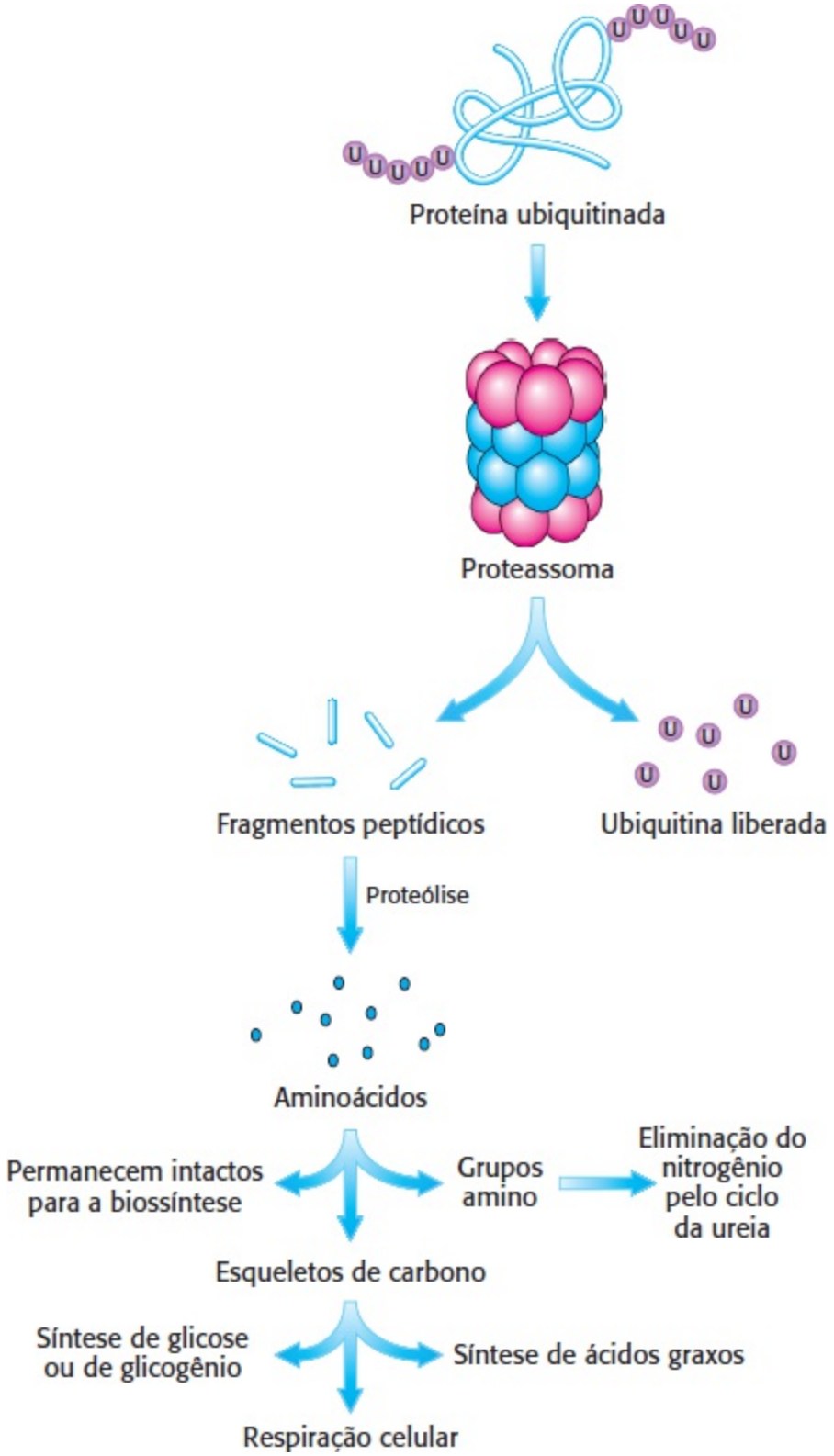


Figura 23.7 O proteassoma e outras proteases geram aminoácidos livres. As proteínas ubiquitinadas são processadas a fragmentos peptídicos, a partir dos quais a ubiquitina é em seguida removida e reciclada. Os fragmentos peptídicos são posteriormente digeridos, produzindo aminoácidos livres, que podem ser utilizados em reações de biossíntese, mais notavelmente na síntese de proteína. Alternativamente, o grupo amino pode ser removido e processado a ureia (p. 689) e o esqueleto de carbono pode ser utilizado para a síntese de carboidratos ou de lipídios ou diretamente como fonte de energia para a respiração celular.

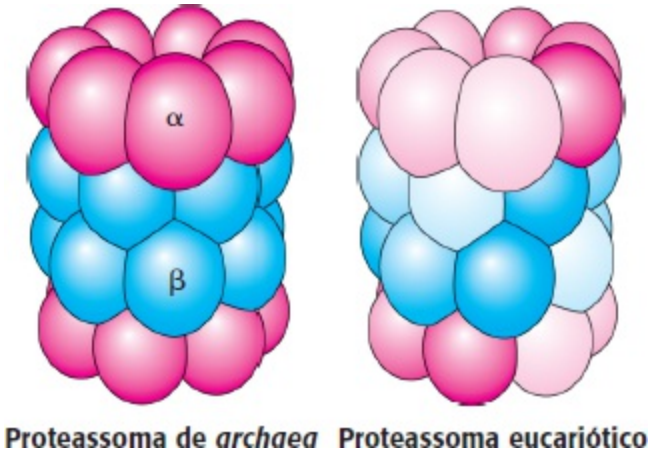
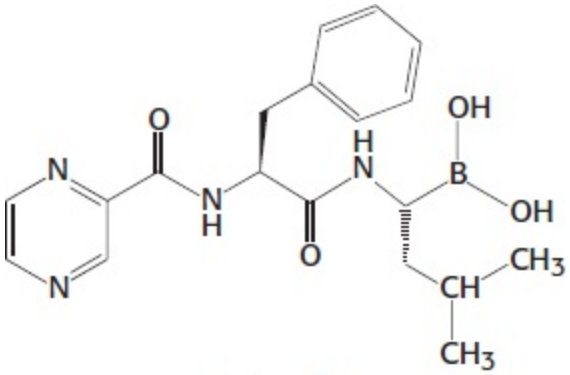


Figura 23.8 Evolução do proteassoma. O proteassoma de *archaea* é constituído de 14 subunidades α idênticas e 14 subunidades β idênticas. No proteassoma eucariótico, a duplicação dos genes e a especialização levaram a sete subunidades distintas de cada tipo. A arquitetura global do proteassoma foi conservada.

Embora a ubiquitina não tenha sido encontrada nos procariotos, ancestrais moleculares da ubiquitina foram recentemente identificados em procariotos. Notavelmente, essas proteínas não atuam na modificação de proteínas, mas na biossíntese da coenzima tiamina. Uma enzima essencial na biossíntese de tiamina é a ThiF, que ativa a proteína ThiS como acil adenilato e, em seguida, acrescenta um íon sulfeto derivado da cisteína (Figura 23.9). A ThiF é homóloga à E1 humana, que inclui duas regiões em tandem de 160 aminoácidos que apresentam uma identidade de 28% na sequência de aminoácidos com uma região da ThiF de *E. coli*. As relações evolutivas entre essas duas vias foram consolidadas pela determinação da estrutura tridimensional da ThiS que revelou uma estrutura muito semelhante à da ubiquitina, apesar de ser somente 14% idêntica na sequência de aminoácidos (Figura 23.10). Por conseguinte, um sistema eucariótico para a modificação de proteínas evoluiu a partir de uma via procariótica preexistente para a biossíntese de coenzima.



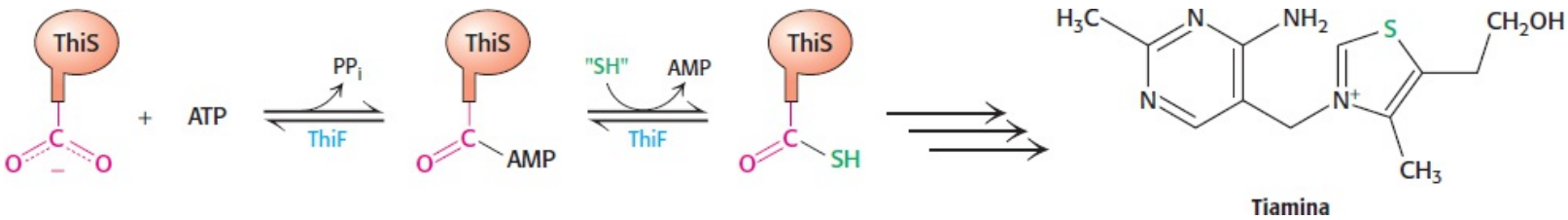


Figura 23.9 Biossíntese da tiamina. A biossíntese da tiamina começa com a adição de sulfeto à extremidade carboxiterminal da proteína ThiS. Essa proteína é ativada por adenilação e conjugada de modo análogo às primeiras etapas da via da ubiquitina.

A degradação de proteínas pode ser utilizada para regular funções biológicas

A Tabela 23.3 fornece uma lista de processos fisiológicos que são controlados, pelo menos em parte, pela degradação de proteínas por meio da via de ubiquitina-proteassoma. Em cada caso, as proteínas que são degradadas consistem em proteínas reguladoras. Considere, por exemplo, o controle da resposta inflamatória. Um fator de transcrição, denominado *NF-k*B (NF de fator nuclear, do inglês *nuclear factor*) inicia a expressão de um certo número de genes que participam nessa resposta. O próprio fator é ativado pela degradação de uma proteína inibitória afixada a ele, a *I-k*B (I de inibidor). Em resposta a sinais inflamatórios que se ligam a receptores ligados à membrana, a *I-k*B é fosforilada em dois resíduos de serina, criando um sítio de ligação de E3. A ligação de E3 leva a ubiquitinação e degradação da I-kB, liberando o NF-kB. O fator de transcrição liberado migra do citoplasma para o núcleo para estimular a transcrição dos genes-alvo. O sistema NF-kB–I-kB ilustra a interação de vários padrões regulatórios essenciais: a transdução de sinais mediada por receptor, a fosforilação, a compartimentalização, a degradação controlada e especifica e a expressão gênica seletiva. A importância do sistema de ubiquitina-proteassoma para a regulação da expressão gênica é ressaltada pela recente aprovação do bortezomibe, um ácido dipeptidil borônico, potente inibidor do proteassoma, como terapia para o mieloma múltiplo.

Tabela 23.3 Processos regulados por degradação de proteínas.

Transcrição gênica
Progressão do ciclo celular
Formação de órgãos
Ritmos circadianos
Resposta inflamatória
Supressão de tumores
Metabolismo do colesterol
Processamento de antígenos

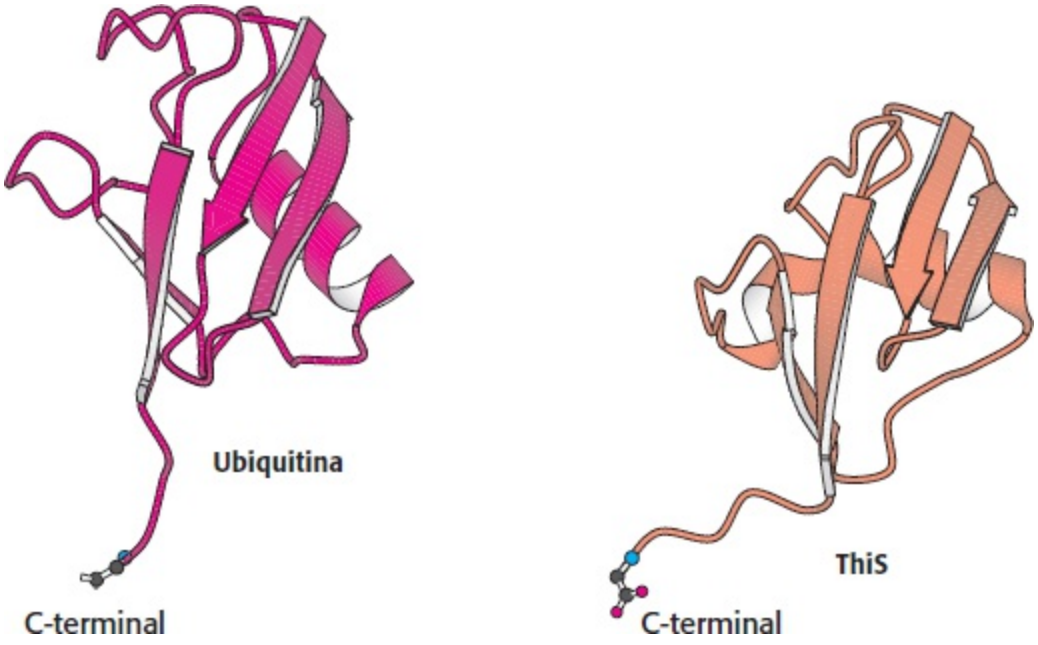
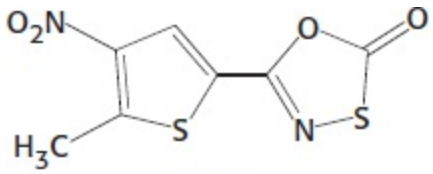


Figura 23.10 Comparação das estruturas da ThiS e da ubiquitina. *Observe* que a ThiS é estruturalmente semelhante à ubiquitina, apesar de uma identidade de sequência de apenas 14%. Essa observação sugere que uma proteína procariótica, como a ThiS, evoluiu para a ubiquitina. [Desenhada a partir de 1UBI. pdb e 1FOZ.pdb.]

Os estudos evolutivos dos proteassomas descritos anteriormente também proporcionaram benefícios clínicos potenciais. A bactéria patogênica, *Mycobacterium tuberculosis*, a causa da tuberculose, abriga um proteassoma que é muito semelhante ao equivalente humano. Entretanto, pesquisas recentes mostraram que é possível explorar as diferenças entre os proteassomas humano e bacteriano para desenvolver inibidores específicos do complexo *M. tuberculosis*. Os compostos oxatiazol-2-ona, como HT1171, são inibidores suicidas da atividade proteolítica do proteassoma de *M. tuberculosis*, porém não exercem nenhum efeito sobre os proteassomas do hospedeiro humano. Isso é particularmente interessante, visto que esses fármacos matam a forma não replicativa do *M. tuberculosis* e, portanto, podem não exigir o tratamento prolongado necessário com fármacos convencionais, diminuindo, assim, a probabilidade de resistência farmacológica devido à interrupção do esquema de tratamento.



HT1171
[5(2-metil-3-nitrotiofen-2-il)-1,3,4-oxatiazol-2-ona]

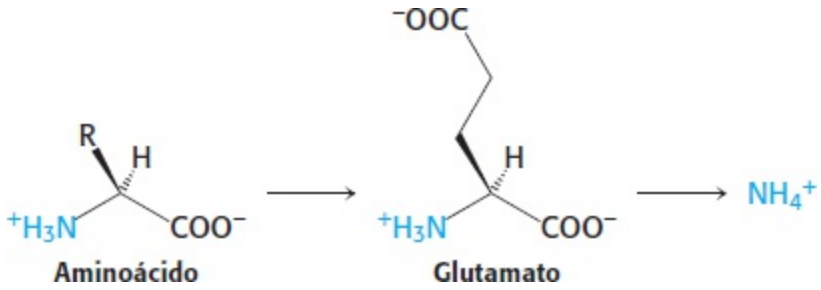
23.3 A primeira etapa na degradação dos aminoácidos consiste na remoção do nitrogênio

Qual é o destino dos aminoácidos liberados com a digestão ou renovação das proteínas? A primeira convocação é para uso como unidades básicas de construção em reações de biossíntese. Todavia, aqueles que não são necessários como unidades básicas de construção são degradados a compostos capazes de entrar na via metabólica principal. Inicialmente o grupo amino é removido, e, a seguir, o

esqueleto de carbono remanescente é metabolizado a glicose, a um dos vários intermediários do ciclo do ácido cítrico ou a acetil-CoA. O principal local de degradação dos aminoácidos nos mamíferos é o fígado, embora o músculo prontamente degrade os aminoácidos de cadeia ramificada (Leu, Ile e Val). Vejamos agora o destino do grupo α-amino; discutiremos o, esqueleto de carbono na Seção 23.5.

Os grupos α-amino são convertidos em íons amônio pela desaminação oxidativa do glutamato

O grupo α-amino de muitos aminoácidos é transferido para o α-cetoglutarato, formando *glutamato*, que sofre então desaminação oxidativa, produzindo o íon amônio (NH_4^+).



As *aminotransferases* catalisam a transferência de um grupo α-amino de um α-aminoácido para um α-cetoácido. Essas enzimas, que também são denominadas *transaminases*, geralmente canalizam os grupos α-amino de uma variedade de aminoácidos para o α-cetoglutarato, para conversão em NH_4^+.

A *aspartato aminotransferase*, uma das mais importantes dessas enzimas, catalisa a transferência do grupo amino do aspartato para o α-cetoglutarato

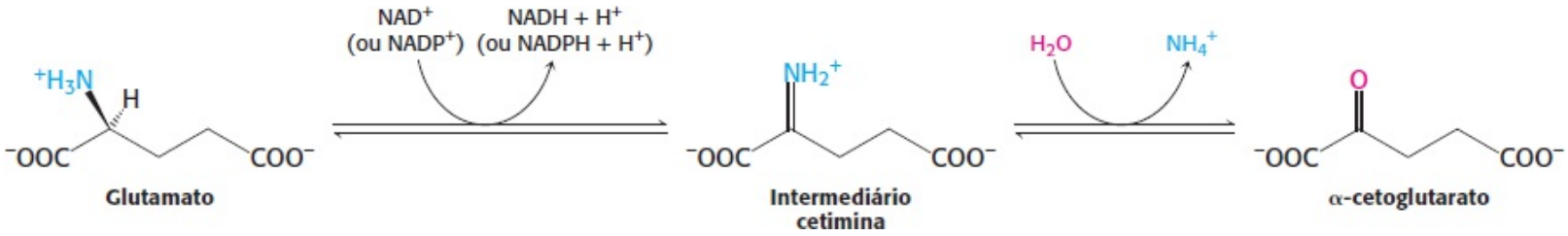
Aspartato + α-cetoglutarato ⇋ oxaloacetato + glutamato

A *alanina aminotransferase* catalisa a transferência do grupo amino da alanina para o α-cetoglutarato

Alanina + α-cetoglutarato ⇋ piruvato + glutamato

Essas reações de transaminação são reversíveis e, portanto, podem ser utilizadas para sintetizar aminoácidos a partir de α-cetoácidos, como veremos no Capítulo 24.

O átomo de nitrogênio no glutamato é convertido em íon amônio livre por desaminação oxidativa. Essa reação é catalisada pela *glutamato desidrogenase*. Essa enzima é incomum, visto que tem a capacidade de utilizar o NAD^+ ou $NADP^+$, pelo menos em algumas espécies. A reação prossegue por desidrogenação da ligação C—N, seguida de hidrólise da aldimina resultante.

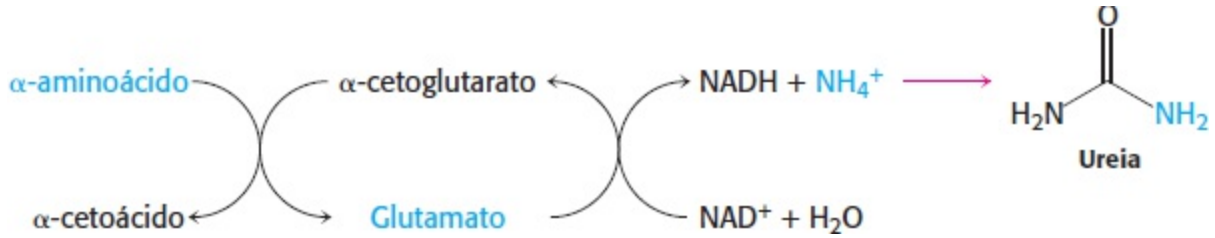


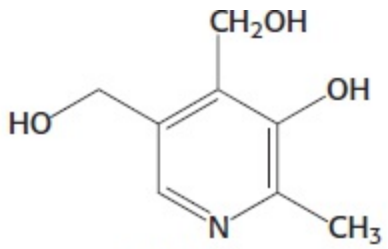
A constante de equilíbrio dessa reação está próximo de 1 no fígado, de modo que o sentido da reação é determinado pelas concentrações dos reagentes e dos produtos. Normalmente, a reação é impulsionada para frente pela rápida remoção dos íons amônios. Nos mamíferos, mas não em outros organismos, o glutamato é alostericamente inibido pelo GTP e palmitoil-CoA, e estimulado pelo ADP e pela leucina. A glutamato desidrogenase, que essencialmente é uma enzima específica do fígado, localiza-se nas mitocôndrias, assim como outras enzimas necessárias para a produção de ureia. Essa compartimentalização sequestra o íon amônio livre, que é toxico.

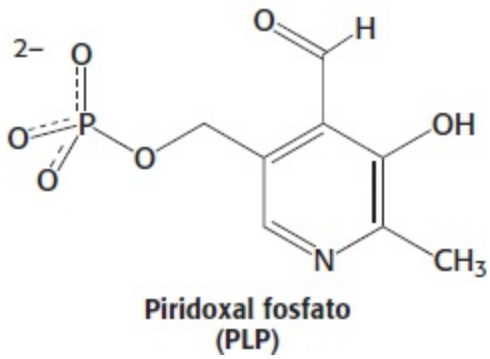
A soma das reações catalisadas pelas aminotransferases e pela glutamato desidrogenase é

$$\underset{\text{(ou NADP+)}}{\alpha\text{-aminoácido} + NAD^+ + H_2O} \rightleftharpoons \alpha\text{-cetoácido} + NH_4^+ + \underset{\text{(ou NADPH)}}{NADH + H^+}$$

Na maioria dos vertebrados terrestres, o NH_4^+ é convertido em ureia, que é excretada.

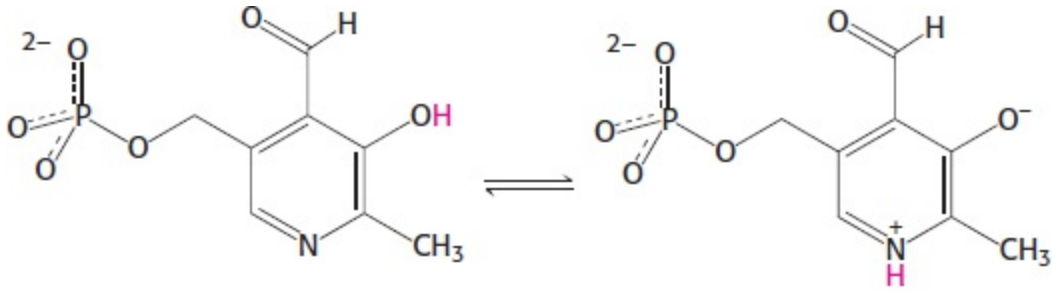




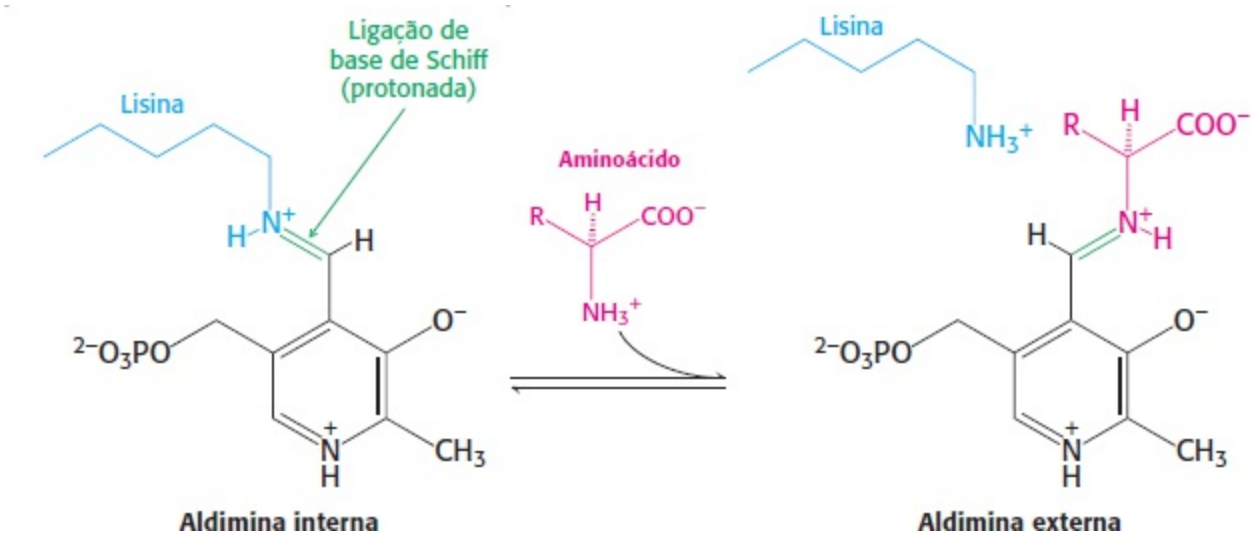


Mecanismo: o piridoxal fosfato forma bases de Schiff intermediárias nas aminotransferases

Todas as aminotransferases contêm o grupo prostético *piridoxal fosfato* (PLP), que provém da *piridoxina (vitamina B_6)*. O piridoxal fosfato inclui um anel de piridina, levemente básico, ao qual está ligado um grupo OH ligeiramente ácido. Por conseguinte, os derivados de piridoxal fosfato podem produzir uma forma tautomérica estável, em que o átomo de nitrogênio da piridina é protonado e, assim, apresenta uma carga positiva, enquanto o grupo OH perde um próton e, portanto, tem uma carga negativa, formando um fenolato.



O grupo funcional mais importante do PLP é o aldeído. Esse grupo forma intermediários covalentes de base de Schiff com os aminoácidos substratos. De fato, mesmo na ausência de substrato, o grupo aldeído do PLP forma habitualmente uma ligação de base de Schiff com o grupo ε-amino de um resíduo de lisina específico no sítio ativo da enzima. Forma-se uma nova ligação de base de Schiff com adição de um aminoácido substrato.



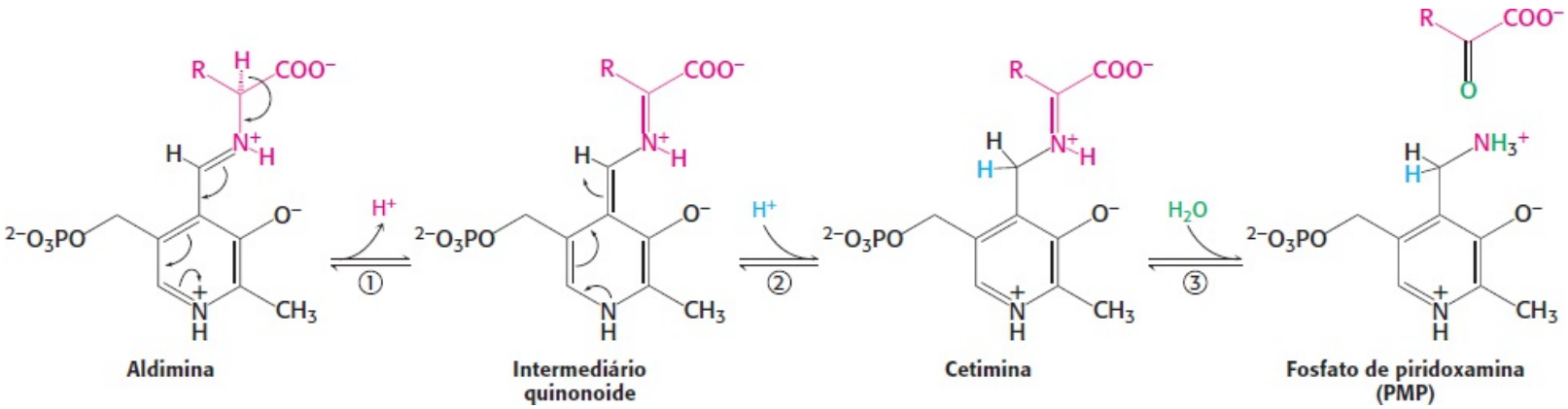
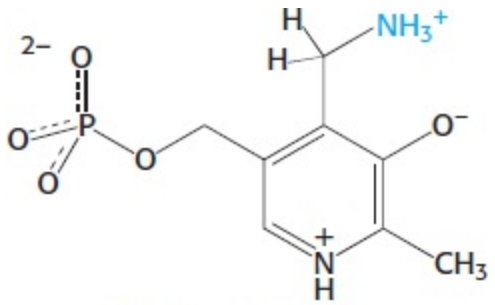


Figura 23.11 Mecanismo de transaminação. **1.** A aldimina externa perde um próton para formar um intermediário quinonoide. **2**. A nova protonação desse intermediário no átomo de carbono aldeído origina uma cetimina. **3.** Esse intermediário é hidrolisado, gerando o produto α-cetoácido e a piridoxamina fosfato.

O grupo α-amino do aminoácido substrato desloca o grupo -amino do resíduo de lisina do sítio ativo. Em outras palavras, uma aldimina *interna* transformase em aldimina *externa*. A base de Schiff aminoácido-PLP formada permanece firmemente ligada à enzima por múltiplas interações não covalentes. Com frequência, a ligação da base de Schiff aceita um próton no N, sendo a carga positiva estabilizada pela interação com o grupo fenolato de carga negativa do PLP.

A base de Schiff entre o substrato de aminoácido e o PLP, a *aldimina* externa, perde um próton do átomo de carbono α do aminoácido para formar um intermediário *quinonoide* (Figura 23.11). Uma nova protonação desse intermediário no átomo de carbono aldeído origina uma *cetimina*. Em seguida, a cetimina é hidrolisada a um α-cetoácido e *piridoxamina fosfato* (PMP). Essas etapas constituem metade da reação de transaminação.



Piridoxamina fosfato (PMP)

$$\text{Aminoácido}_1 + \text{E-PLP} \leftrightharpoons \alpha\text{-cetoácido}_1 + \text{E-PMP}$$

A segunda metade ocorre pela reversão da via precedente. Um segundo α-cetoácido reage com o complexo enzima-piridoxamina fosfato (E-PMP), produzindo um segundo aminoácido e regenerando o complexo enzima-piridoxal fosfato (E-PLP).

$$\alpha\text{-cetoácido}_2 + \text{E-PMP} \leftrightharpoons \text{aminoácido}_2 + \text{E-PLP}$$

A soma dessas reações parciais é

$$\text{Aminoácido}_1 + \alpha\text{-cetoácido}_2 \leftrightharpoons + \text{aminoácido}_2 + \alpha\text{-cetoácido}_1$$

A aspartato aminotransferase é um arquétipo da transaminase dependente de piridoxal

A aspartato aminotransferase, um enzima mitocondrial, fornece um exemplo particularmente bem estudado de PLP como coenzima para reações de transaminação (Figura 23.12). Os resultados de estudos cristalográficos de raios X forneceram detalhes de como o PLP e os substratos se ligam e confirmaram grande parte do mecanismo catalítico proposto. Cada uma das subunidades idênticas de 45 kDa desse dímero é constituída de um domínio grande e um pequeno. O PLP liga-se ao domínio grande, em uma bolsa próxima à interface da subunidade. Na ausência de substrato, o grupo aldeído do PLP fica em uma ligação de base de Schiff com a lisina 258, conforme esperado. Adjacente ao sítio de ligação da coenzima, há um resíduo de arginina conservado, que interage com o grupo α-carboxilato do aminoácido substrato, ajudando-o a se orientar apropriadamente no sítio ativo. É necessária uma base para remover um próton do grupo carbono α do aminoácido e transferi-lo ao átomo de carbono aldeído do PLP (ver Figura 23.11, etapas 1 e 2). O grupo amino da lisina que estava inicialmente em ligação de base de Schiff com o PLP parece atuar como doador e aceptor do

próton.

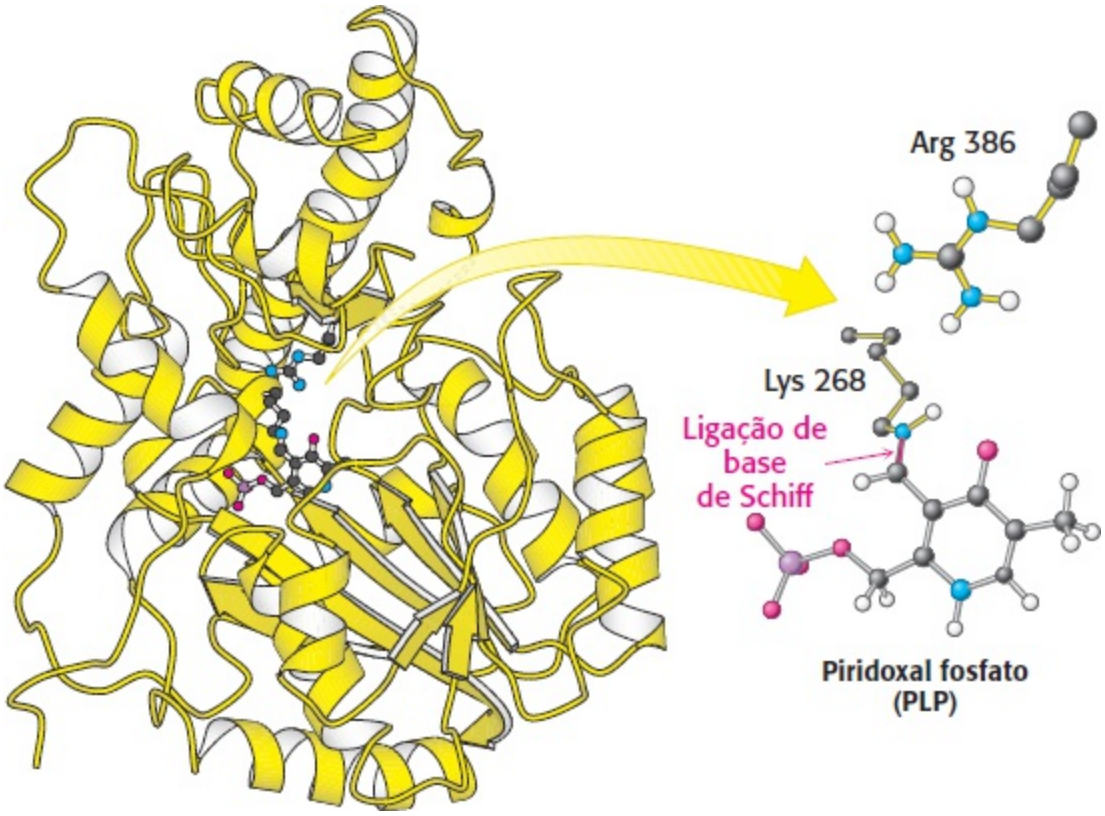


Figura 23.12 Aspartato aminotransferase. O sítio ativo desse protótipo de enzima dependente de PLP inclui o piridoxal fosfato ligado à enzima por uma ligação de base de Schiff com a lisina 258. Um resíduo de arginina no sítio ativo ajuda a orientar os substratos por meio de ligação a seus grupos α-carboxilato. A figura mostra apenas uma das duas subunidades da enzima. [Desenhada a partir de 1AAW.pdb.]

As enzimas dependentes de piridoxal fosfato catalisam uma ampla gama de reações

A transaminação é apenas uma de várias transformações dos aminoácidos, que são catalisadas por enzimas dependentes de PLP. As outras reações catalisadas por essas enzimas no átomo de carbono α dos aminoácidos consistem em descarboxilações, desaminações, racemizações e clivagens aldol (Figura 23.13). Além disso, as enzimas dependentes de PLP catalisam reações de eliminação e de substituição no átomo de carbono-β (p.ex., a triptofano sintetase na síntese do triptofano) e no átomo de carbono- (p.ex., a cistationina β-sintase na síntese de cisteína) de aminoácidos substratos. Essas diversas reações apresentam três características comuns da catálise pelo PLP.

1. Forma-se uma base de Schiff entre o substrato de aminoácido (o componente amínico) e o PLP (o componente carbonílico).

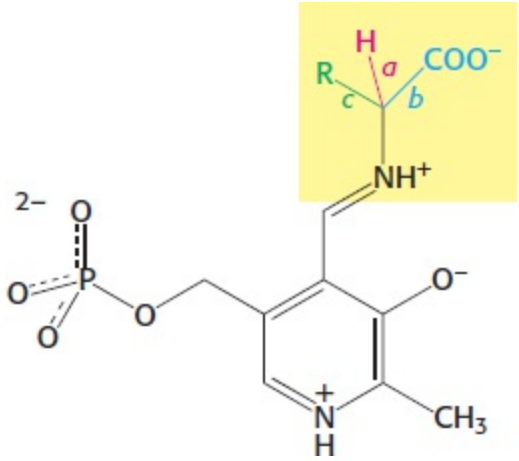


Figura 23.13 Clivagem de ligação por enzimas dependentes de PLP. As enzimas com piridoxal fosfato tornam lábil uma das três ligações no átomo de carbono α de um aminoácido substrato. Por exemplo, a ligação *a* é labilizada por aminotransferases, a ligação *b*, por descarboxilases, e a ligação *c*, por aldolases (como as treonina aldolases). As enzimas dependentes de PLP também catalisam reações nos átomos de carbono β e γ dos aminoácidos.

2. A forma protonada do PLP atua como *escoadouro de elétrons* para estabilizar os intermediários catalíticos que apresentam cargas negativas. Os elétrons desses intermediários são atraídos pela carga positiva do átomo de nitrogênio do anel. Em outras palavras, o PLP é um *catalisador eletrofílico*.

3. O produto da base de Schiff é clivado no final da reação.

Como uma enzima rompe seletivamente uma das três ligações no átomo de carbono α de um aminoácido substrato? Um princípio importante é de que *a ligação que está sendo rompida precisa ser perpendicular aos orbitais do escoadouro de elétrons* (Figura 23.14). Por exemplo, uma aminotransferase liga o aminoácido, substrato, de modo que a ligação C_α—H seja perpendicular ao anel do PLP (Figura 23.15). Na serina hidroximetil transferase, a enzima que converte a serina em glicina, ocorre rotação da ligação N—C_α , de modo que a ligação C_α—C_β, fique quase perpendicular ao plano do anel do PLP, favorecendo a sua clivagem. Esse mecanismo de escolha de um dos vários resultados catalíticos possíveis é denominado *controle estereoeletrônico*.

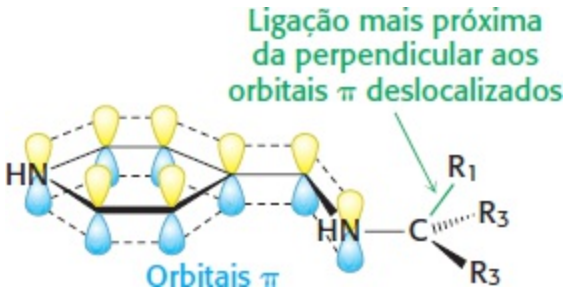


Figura 23.14 Efeitos estereoeletrônicos. A orientação ao redor da ligação NH–C_α determina a reação mais favorecida, catalisada por uma enzima dependente de piridoxal fosfato. A ligação que está mais próxima a uma perpendicular do plano dos orbitais π deslocalizados (representados por linhas tracejadas) do escoadouro de elétrons do piridoxal fosfato é mais facilmente clivada.

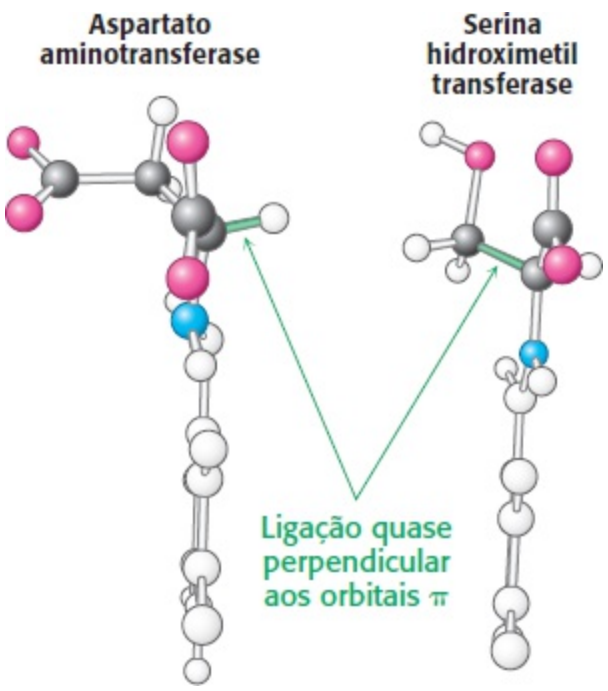


Figura 23.15 Escolha da reação. Na aspartato aminotransferase, a ligação C_α–H é quase perpendicular ao sistema de orbitais π e é clivada. Na serina hidroximetil transferase, uma pequena rotação ao redor da ligação N–C_α coloca a ligação C_α–C_β perpendicular ao sistema π, favorecendo a sua clivagem.

Muitas enzimas de PLP que catalisam transformações de aminoácidos, como a serina hidroximetil transferase, apresentam uma estrutura semelhante e estão claramente relacionadas por evolução divergente. Outras, como a triptofano sintetase, têm estruturas globais muito diferentes. Todavia, os sítios ativos dessas enzimas são notavelmente semelhantes aos da aspartato aminotransferase, revelando os efeitos da evolução convergente.

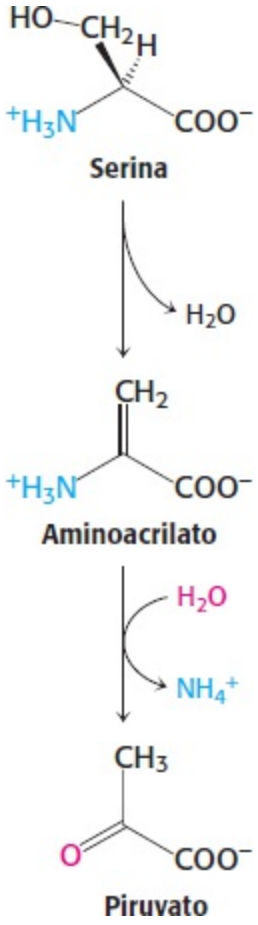
A serina e a treonina podem ser diretamente desaminadas

Os grupos α-amino da serina e da treonina podem ser convertidos diretamente em NH_4^+, sem serem inicialmente transferidos para o α-cetoglutarato. Essas desaminações diretas são catalisadas pela *serina desidratase* e pela *treonina desidratase,* onde o PLP é o grupo prostético.

$$\text{Serina} \rightarrow \text{piruvato} + NH_4^+$$

$$\text{Treonina} \rightarrow \alpha\text{-cetobutirato} + NH_4^+$$

Essas enzimas são denominadas *desidratases*, visto que a *desidratação precede a desaminação*. A serina perde um íon hidrogênio de seu átomo de carbono α e um íon hidróxido de seu átomo de carbono β, produzindo aminoacrilato. Esse composto instável reage com H_2O, originando piruvato e NH_4^+. Por conseguinte, a presença de um grupo hidroxila fixado ao átomo de carbono β em cada um desses aminoácidos possibilita uma desaminação direta.



Os tecidos periféricos transportam nitrogênio para o fígado

Embora a maior parte da degradação dos aminoácidos ocorra no fígado, outros tecidos também podem degradar aminoácidos. Por exemplo, o músculo utiliza aminoácidos de cadeia ramificada como fonte de energia durante o exercício prolongado e o jejum. Como o nitrogênio é processado nesses outros tecidos? Como ocorre no fígado, a primeira etapa consiste na remoção do nitrogênio do aminoácido. Entretanto, o músculo carece das enzimas do ciclo da ureia, de modo que o nitrogênio precisa ser liberado em uma forma atóxica que possa ser absorvida pelo fígado e convertida em ureia.

O nitrogênio é transportado do músculo para o fígado em duas formas principais de transporte. Ocorre formação de glutamato por reações de transaminação, porém o nitrogênio é então transferido para o piruvato, formando alanina, que é liberada no sangue (Figura 23.16). O fígado capta a alanina e a converte de volta em piruvato por transaminação. O piruvato pode ser utilizado para a gliconeogênese, e o grupo amino finalmente aparece como ureia. Esse transporte é designado como ciclo de *glicose-alanina* e lembra o ciclo de Cori discutido anteriormente (ver Figura 16.33). Todavia, diferentemente do ciclo de Cori, o piruvato não é reduzido a lactato pelo NADH, e, portanto, maior quantidade de elétrons de alta energia torna-se disponível para a fosforilação oxidativa.

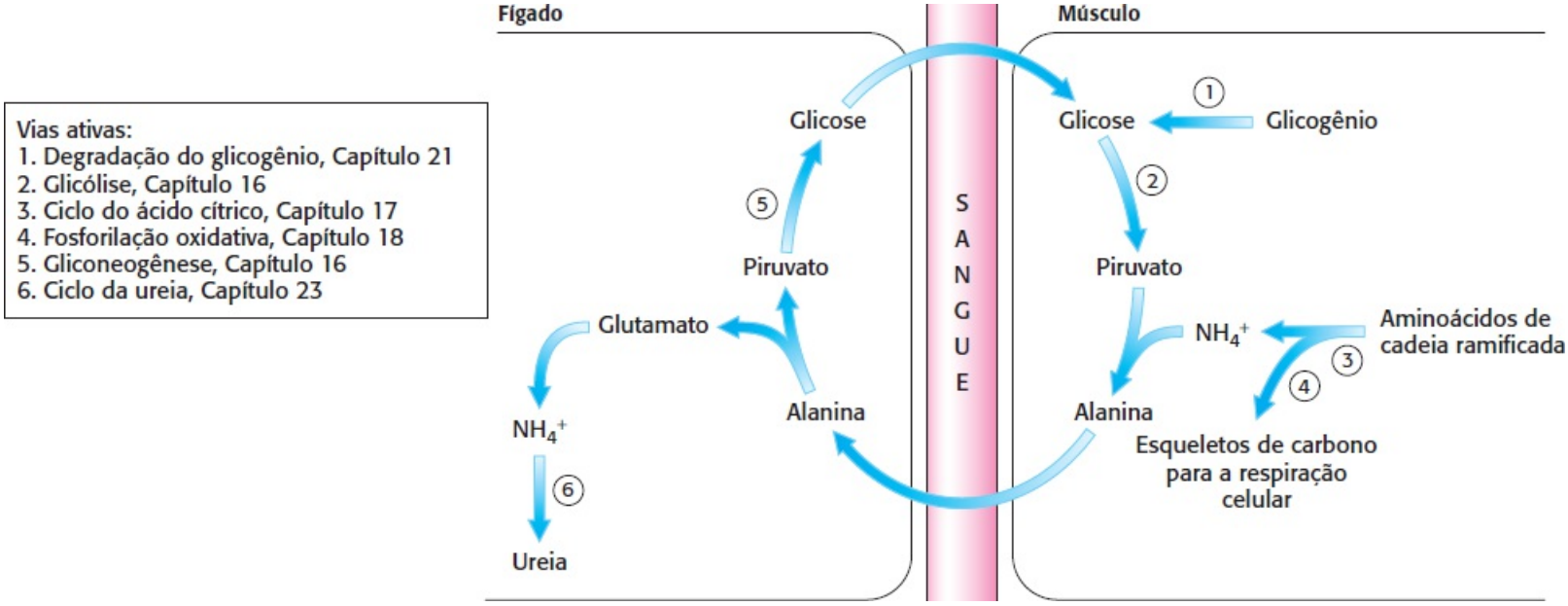


Figura 23.16 Integração das vias: o ciclo glicose-alanina. Durante o exercício prolongado e o jejum, o músculo utiliza aminoácidos de cadeia ramificada como fonte de energia. O nitrogênio removido é transferido (através do glutamato) para a alanina, que é liberada na corrente sanguínea. No fígado, a alanina é captada e convertida em piruvato para a síntese subsequente de glicose.

O nitrogênio também pode ser transportado como glutamina. A glutamina sintetase catalisa a síntese da glutamina a partir do glutamato e NH_4^+, em uma reação dependente de ATP:

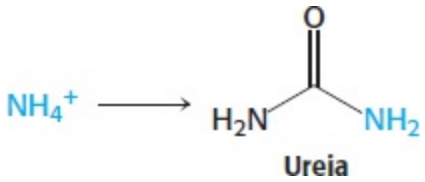
$$NH_4^+ + \text{glutamato} + ATP \xrightarrow{\text{Glutamina sintetase}} \text{glutamina} + ADP + P_i$$

Os nitrogênios da glutamina podem ser convertidos em ureia no fígado.

23.4 O íon amônio é convertido em ureia na maioria dos vertebrados terrestres

Parte do NH_4^+ formado na degradação dos aminoácidos é consumida na biossíntese de compostos nitrogenados. Na maioria dos vertebrados terrestres, o excesso de NH_4^+ é convertido em *ureia*, que é então excretada. Esses organismos são denominados *ureotélicos*.

Nos vertebrados terrestres, a ureia é sintetizada pelo *ciclo da ureia* (Figura 23.17). Esse ciclo, proposto por Hans Krebs e Kurt Henseleit em 1932, foi a primeira via metabólica cíclica a ser descoberta. Um dos átomos do nitrogênio da ureia é transferido de um aminoácido, o aspartato. O outro átomo de nitrogênio provém diretamente do NH_4^+ livre, e o átomo de carbono deriva do HCO_3^- (produzido pela hidratação do CO_2; ver Seção 9.2).



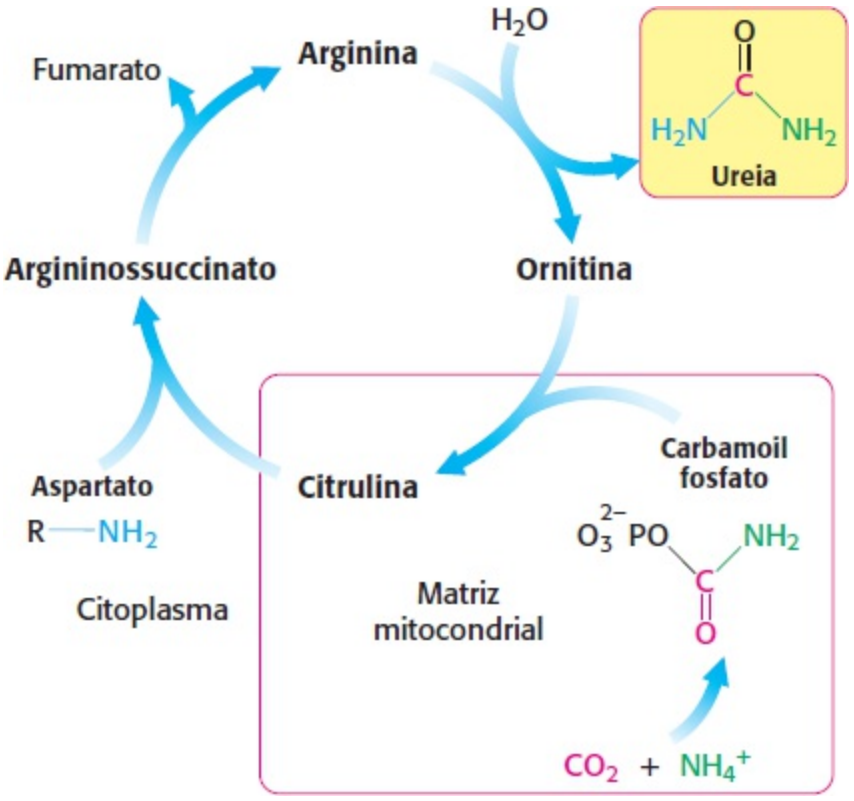
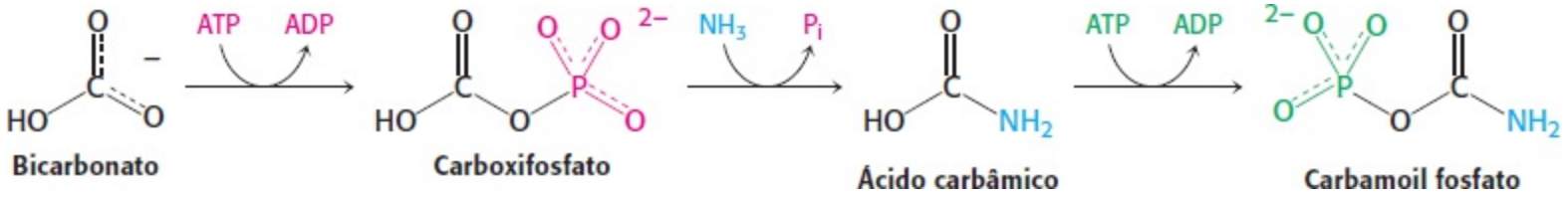


Figura 23.17 O ciclo da ureia.

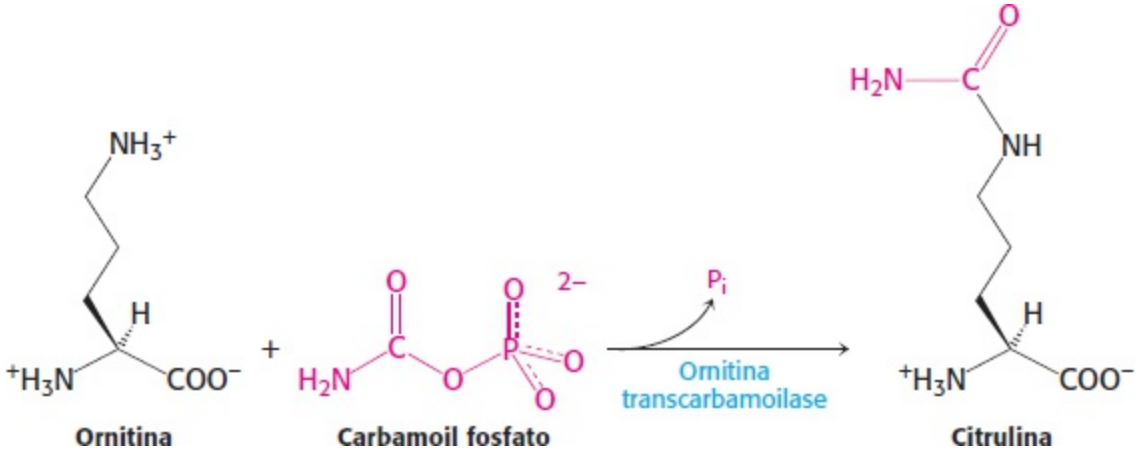
O ciclo da ureia começa com a formação de carbamoil fosfato

O ciclo da ureia começa com o acoplamento de NH_3 livre com HCO_3^-, formando carbamoil fosfato. O carbamoil fosfato é uma molécula simples, porém a sua síntese é complexa. A *carbamoil fosfato sintetase* catalisa as três etapas necessárias.



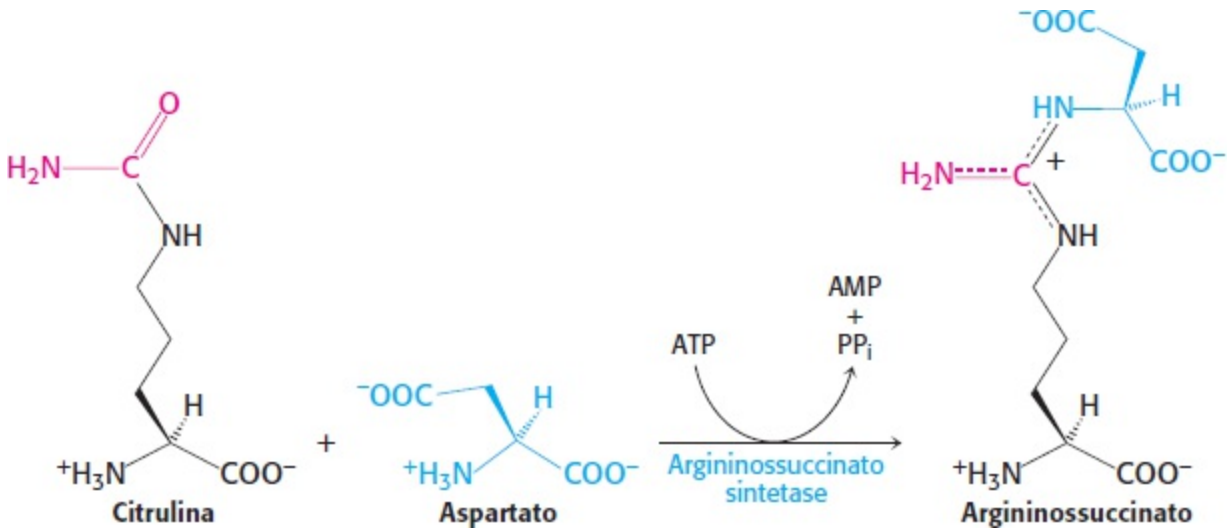
Observe que a NH_3, por ser uma base forte, existe normalmente na forma de NH_4^+ em solução aquosa. Todavia, a carbamoil fosfato sintetase utiliza apenas a NH_3 como substrato. A reação começa com a fosforilação do HCO_3^-, formando carboxifosfato, que reage então com NH_3 para formar ácido carbâmico. Por fim, uma segunda molécula de ATP fosforila o ácido carbâmico, formando carbamoil fosfato. A estrutura e o mecanismo da enzima que catalisa essas reações são apresentados no Capítulo 25. O consumo de duas moléculas de ATP torna essa síntese de carbamoil fosfato essencialmente irreversível. A enzima dos mamíferos exige a presença de N-*acetilglutamato* para a sua atividade, conforme descrito adiante.

O grupo carbamoil do carbamoil fosfato apresenta alto potencial de transferência, em virtude de sua ligação anidrido. O grupo carbamoil é transferido para a *ornitina*, formando *citrulina*, em uma reação catalisada pela *ornitina transcarbamoilase*.

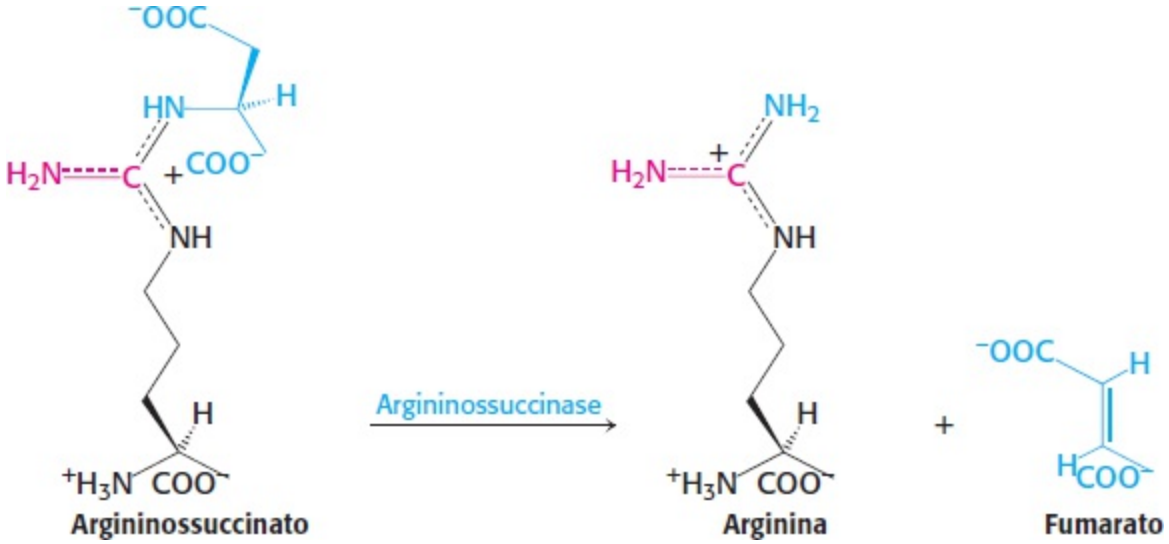


A ornitina e a citrulina são aminoácidos, porém elas não são usadas como unidades básicas de construção de proteínas. A formação de NH_4^+ pela glutamato desidrogenase, a sua incorporação no carbamoil fosfato como NH_3 e a síntese subsequente de citrulina ocorrem na matriz mitocondrial. Em contrapartida, as três reações seguintes do ciclo da ureia, que levam à formação de ureia, ocorrem no citoplasma.

A citrulina é transportada para o citoplasma, onde se condensa com o aspartato, o doador do segundo grupo amino da ureia. Essa síntese de argininossuccinato, catalisada pela *argininossuccinato sintetase*, é impulsionada pela clivagem do ATP em AMP e pirofosfato e pela hidrólise subsequente do pirofosfato.



A *argininossuccinase* cliva o argininossuccinato em *arginina* e *fumarato*. Por conseguinte, o esqueleto carbonado do aspartato é preservado na forma de fumarato.



Por fim, a arginina é hidrolisada, gerando ureia e ornitina, em uma reação catalisada pela *arginase*. A seguir, a ornitina é transportada de volta à mitocôndria para iniciar outro ciclo. A ureia é excretada; os seres humanos excretam cerca de 10 kg de ureia por ano.

Na Roma antiga, a urina era um artigo valioso. Recipientes eram colocados nas esquinas para que os transeuntes pudessem urinar. As bactérias degradavam a ureia, liberando íon amônio, que era usado como alvejante para clarear togas.

O ciclo da ureia está ligado à gliconeogênese

A estequiometria da síntese da ureia é

$$CO_2 + NH_4^+ + 3\ ATP + aspartato + 2\ H_2O \rightarrow$$
$$ureia + 2\ ADP + P_i + AMP + PP_i + fumarato$$

O pirofosfato é rapidamente hidrolisado, e, assim, o equivalente de quatro moléculas de ATP é consumido nessas reações para sintetizar uma molécula de ureia. A síntese de fumarato pelo ciclo da ureia é importante, visto que ele é um precursor para a síntese de glicose (Figura 23.18). O fumarato é hidratado a malato, que, por sua vez, é oxidado a oxaloacetato. O oxaloacetato pode ser convertido em glicose pela gliconeogênese, ou pode ser transaminado a aspartato.

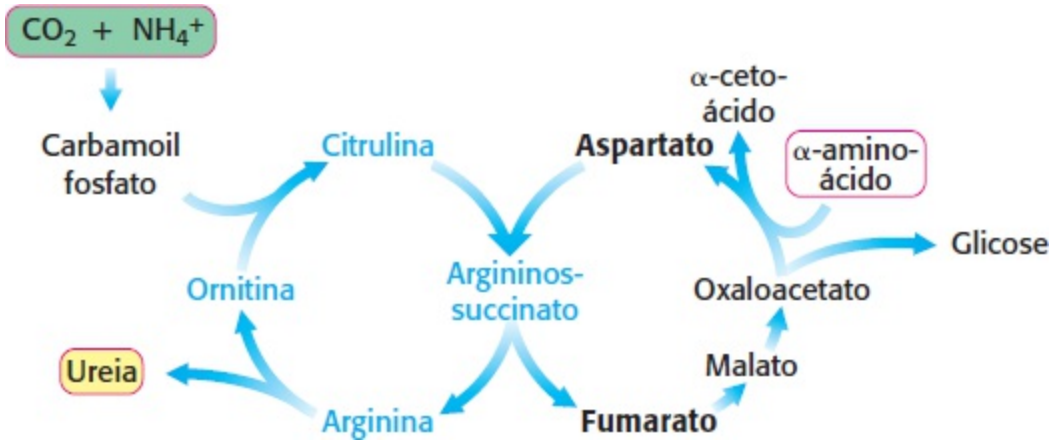


Figura 23.18 Integração metabólica do metabolismo do nitrogênio. O ciclo da ureia, a gliconeogênese e a transaminação do oxaloacetato estão ligados pelo fumarato e pelo aspartato.

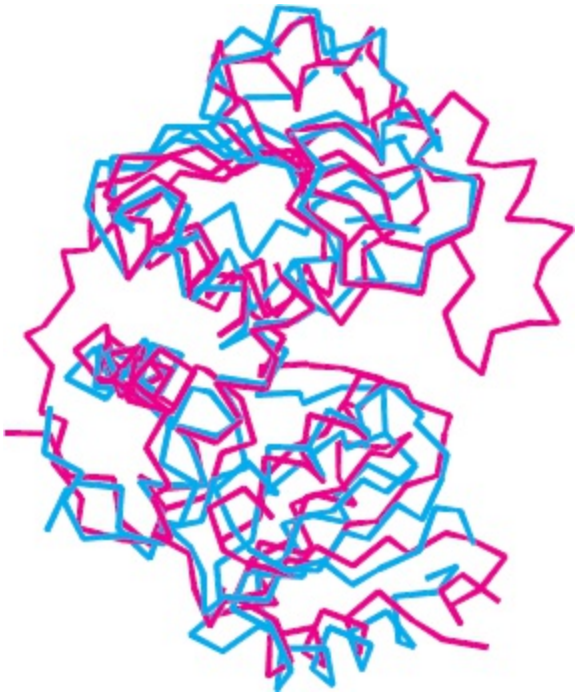
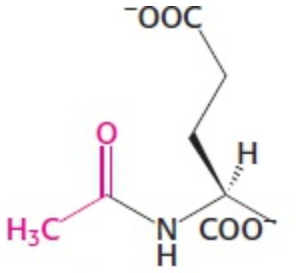


Figura 23.19 Enzimas homólogas. A estrutura da subunidade catalítica da ornitina transcarbamoilase (azul) é muito semelhante à da subunidade catalítica da aspartato transcarbamoilase (vermelho), indicando que essas duas enzimas são homólogas. [Desenhada a partir de 1RKM.pdb e 1RAI.pdb.]

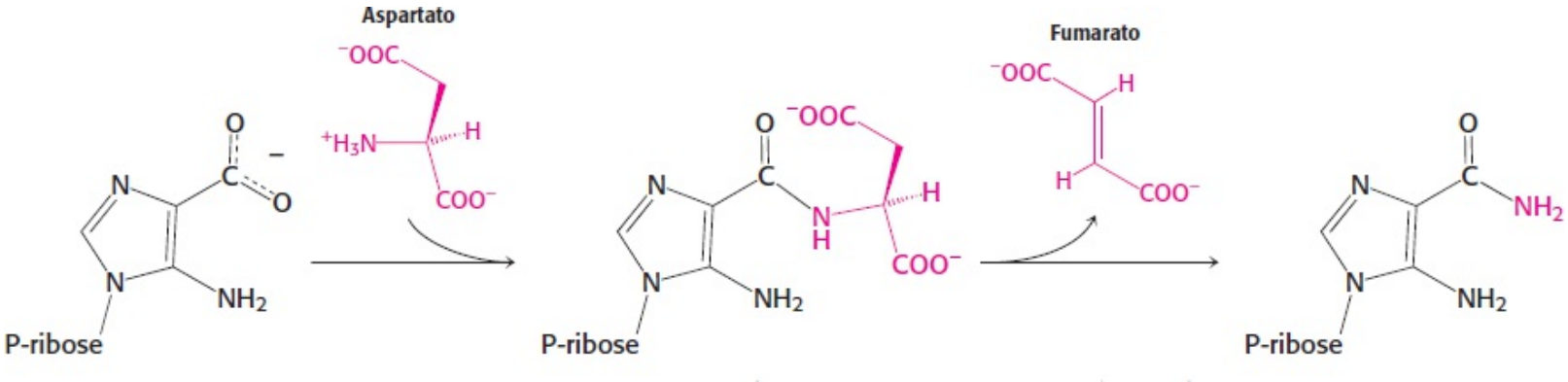
As enzimas do ciclo da ureia têm uma relação evolutiva com enzimas de outras vias metabólicas

A carbamoil fosfato sintetase gera carbamoil fosfato para o ciclo da ureia, bem como para a primeira etapa da biossíntese de pirimidinas (Seção 25.1). Nos mamíferos, são encontradas duas isoenzimas distintas da enzima. A carbamoil fosfato sintetase utilizada na biossíntese de pirimidina difere em dois aspectos importantes de seu congênere do ciclo da ureia. Em primeiro lugar, essa enzima utiliza glutamina como fonte de nitrogênio, e não NH_3. A amida da cadeia lateral da glutamina é hidrolisada dentro de um domínio da enzima, e a amônia produzida move-se através de um túnel na enzima para um segundo sítio ativo, onde reage com carboxifosfato. Em segundo lugar, essa enzima faz parte de um grande polipeptídio, denominado CAD, que compreende três enzimas distintas: a *c*arbamoil fosfato sintetase, a *a*spartato transcarbamoilase e a *d*i-hidro-orotase. Todas essas três enzimas catalisam etapas na biossíntese das pirimidinas (Seção 25.1). É interessante assinalar que o domínio no qual ocorre a hidrólise da glutamina é, em grande parte, preservado na enzima do ciclo da ureia, embora esse domínio seja cataliticamente inativo. Esse sítio liga-se ao *N*-acetilglutamato, um ativador alostérico da enzima. O N-acetilglutamato é sintetizado sempre que ocorre aumento na taxa de catabolismo dos aminoácidos e, consequentemente, sinaliza que o íon amônio produzido no catabolismo de aminoácidos livres precisa ser eliminado. *Um sítio catalítico em uma isoenzima foi adaptado para atuar como sítio alostérico em outra isoenzima que desempenha um papel fisiológico diferente.*



N-acetilglutamato

É possível encontrar homólogos das outras enzimas no ciclo da ureia? A ornitina transcarbamoilase é homológa à aspartato transcarbamoilase, que catalisa a primeira etapa na biossíntese de pirimidinas, e as estruturas das subunidades catalíticas são muito semelhantes (Figura 23.19). Assim, duas etapas consecutivas na via de biossíntese das pirimidinas foram adaptadas para a síntese de ureia. A etapa seguinte no ciclo da ureia consiste na adição de aspartato à citrulina para formar argininossuccinato, e a etapa subsequente é a remoção do fumarato. Essas duas etapas juntas são responsáveis pela adição efetiva de um grupo amino à citrulina, formando arginina. De modo notável, essas etapas são análogas à duas etapas consecutivas na via de biossíntese das purinas (Seção 25.2).



As enzimas que catalisam essas etapas são homólogas à argininossuccinato sintetase e argininossuccinase, respectivamente. Por conseguinte, quatro das cinco enzimas do ciclo da ureia foram adaptadas a partir de enzimas que atuam na biossíntese de nucleotídios. A enzima restante, a arginase, parece ser uma antiga enzima encontrada em todos os domínios da vida.

Os defeitos hereditários do ciclo da ureia causam hiperamonemia e podem levar à lesão cerebral

A síntese de ureia no fígado constitui a principal via de remoção do NH_4^+. A ocorrência de um bloqueio na síntese de carbamoil fosfato ou em qualquer uma das quatro etapas do ciclo da ureia tem consequências devastadoras, visto que não existe nenhuma via alternativa para a síntese de ureia. *Todos os defeitos do ciclo da ureia resultam em níveis elevados de* NH_4^+ *no sangue (hiperamonemia)*. Alguns desses defeitos genéticos tornam-se evidentes 1 ou 2 dias após o nascimento, quando o lactente afetado torna-se letárgico e apresenta vômitos periódicos. Em pouco tempo, podem ocorrer coma e lesão cerebral irreversível. Por que os altos níveis de NH_4^+? A resposta a essa pergunta ainda não é conhecida. Entretanto, pesquisas recentes sugerem que o NH_4^+ pode ativar inapropriadamente um cotransportador de sódio-potássio-cloreto. Essa ativação compromete o equilíbrio osmótico da célula nervosa, causando edema que lesiona a célula e resulta

em distúrbios neurológicos.

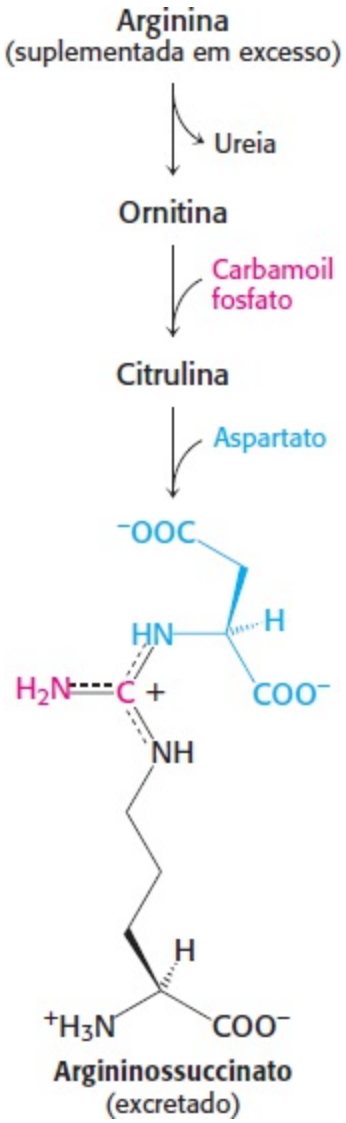


Figura 23.20 Tratamento da deficiência de argininossuccinase. A deficiência de argininossuccinase pode ser tratada mediante suplementação alimentar de arginina. O nitrogênio é excretado na forma de argininossuccinato.

Estratégias engenhosas para enfrentar as deficiências na síntese de ureia foram planejadas com base na compreensão pormenorizada da bioquímica subjacente. Por exemplo, considere a *deficiência de argininossuccinase*. Esse defeito pode ser transposto, em parte, pelo *suprimento de um excesso de arginina na alimentação e restrição da ingestão total de proteínas.* No fígado, a arginina é clivada em ureia e ornitina, que então reage com carbamoil fosfato para formar citrulina (Figura 23.20). Esse intermediário do ciclo da ureia condensa-se com o aspartato, produzindo argininossuccinato, que é então excretado. Observe que dois átomos de nitrogênio – um do carbamoil fosfato e outro do aspartato – são eliminados do corpo para cada molécula de arginina fornecida na alimentação. Em essência, *o argininossuccinato substitui a ureia no transporte de nitrogênio para fora do organismo.*

O tratamento da *deficiência da carbamoil fosfato sintetase* ou da *deficiência de ornitina transcarbamoilase* ilustra uma estratégia diferente para contornar um bloqueio metabólico. A citrulina e a argininossuccinato não podem ser utilizadas para eliminar átomos de nitrogênio, visto que a sua formação está comprometida. Nessas condições o excesso de nitrogênio acumula-se na glicina e na glutamina. Por conseguinte, o desafio é livrar o organismo do acúmulo de nitrogênio

nesses dois aminoácidos. Essa meta é alcançada mediante suplementação de uma dieta restrita em proteínas, com *grandes quantidades de benzoato e fenilacetato*. O benzoato é ativado a benzoil-CoA, que reage com glicina para formar hipurato (Figura 23.21). De forma semelhante, o fenilacetato é ativado a fenilacetil-CoA, que reage com glutamina, formando fenilacetil glutamina. Esses conjugados substituem a ureia na eliminação do nitrogênio. *Por conseguinte, vias bioquímicas latentes podem ser ativadas para transpor parcialmente um defeito genético.*

A ureia não constitui o único meio de eliminação do excesso de nitrogênio

Conforme assinalado anteriormente, os vertebrados terrestres são, em sua maioria, ureotélicos; eles excretam o excesso de nitrogênio na forma de ureia. Todavia, a ureia não constitui a única forma de excreção de nitrogênio. *Os organismos amoniotélicos, como os vertebrados e invertebrados aquáticos, liberam nitrogênio na forma de* NH_4^+ e dependem do ambiente aquoso para diluir essa substância tóxica. É interessante observar que os peixes pulmonados, que normalmente são amoniotélicos, tornam-se ureotélicos em épocas de seca, quando vivem fora da água.

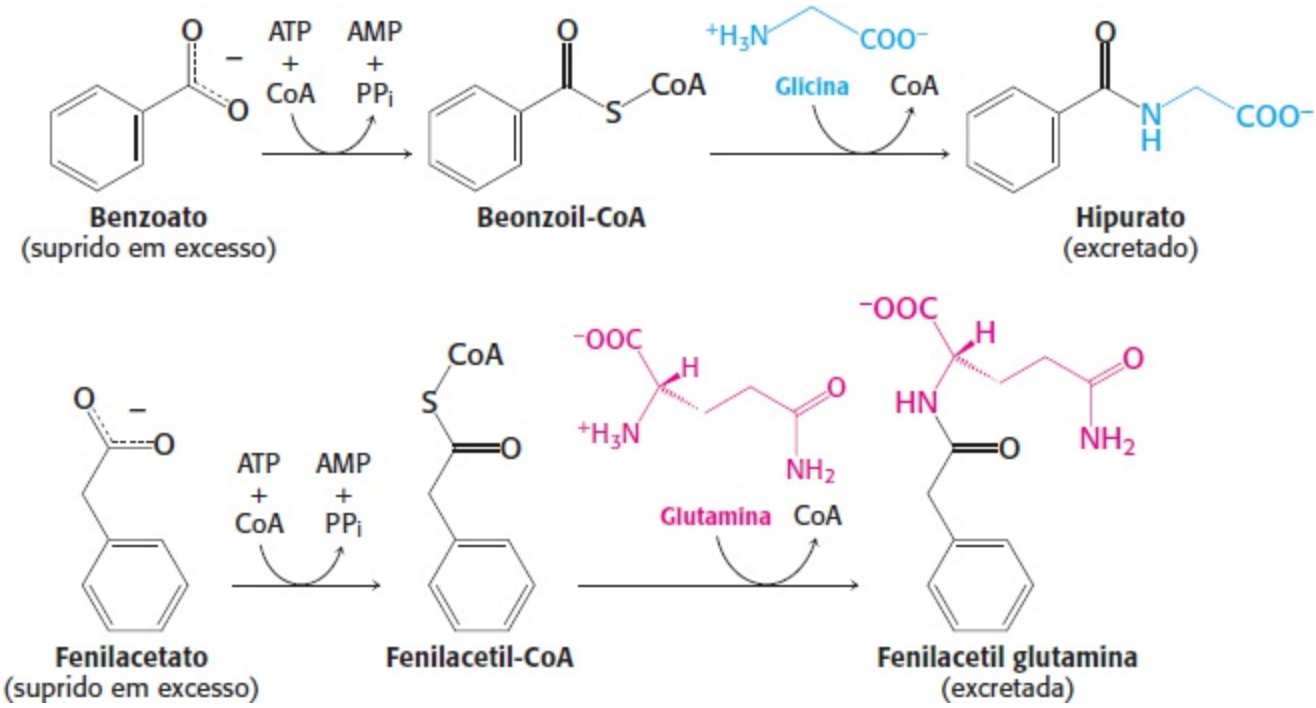


Figura 23.21 Tratamento das deficiências de carbamoil fosfato sintetase e ornitina transcarbamoilase. Ambas as deficiências podem ser tratadas pela suplementação alimentar com benzoato e fenilacetato. O nitrogênio é excretado na forma de hipurato e fenilacetil glutamina.

Tanto os organismos ureotélicos quanto os amoniotélicos dependem, em graus variáveis, de água suficiente para a excreção do nitrogênio. *Em contrapartida, os organismos uricotélicos, como as aves e os répteis, secretam nitrogênio na forma de ácido úrico, uma purina.* O ácido úrico é secretado como massa quase sólida, que necessita de pouca água. A secreção de ácido úrico também tem a vantagem de remover quatro átomos de nitrogênio por molécula. A via de excreção de nitrogênio desenvolvida ao longo da evolução depende claramente do *habitat* do organismo.

23.5 Os átomos de carbono dos aminoácidos degradados emergem como intermediários metabólicos importantes

Analisaremos agora os destinos dos esqueletos de carbono dos aminoácidos após a remoção do grupo α-amino. *A estratégia da degradação dos aminoácidos consiste em transformar os esqueletos de carbono em intermediários metabólicos importantes que possam ser convertidos em glicose ou oxidados pelo ciclo do ácido cítrico.* As vias de conversão variam de extremamente simples até muito complexas. Os esqueletos carbonados do conjunto diversificado de 20 aminoácidos fundamentais convergem para apenas sete moléculas: *piruvato, acetil-CoA, acetoacetil-CoA, α-cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato e oxaloacetato.* Em seguida, veremos um exemplo da notável economia das conversões metabólicas.

Os aminoácidos que são degradados em acetil-CoA ou em acetoacetil-CoA são denominados aminoácidos *cetogênicos*, visto que podem originar corpos cetônicos ou ácidos graxos. Os aminoácidos que são degradados a piruvato, α-cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato ou oxaloacetato são denominados aminoácidos *glicogênicos*. A síntese final de glicose a partir desses aminoácidos é possível, visto que esses intermediários do ciclo do ácido cítrico e o piruvato podem ser convertidos em fosfoenol piruvato e, a seguir, em glicose (Seção 16.3). É importante lembrar que os mamíferos carecem de uma via para a síntese final de glicose a partir de acetil-CoA ou acetoacetil-CoA.

Do conjunto básico de 20 aminoácidos, apenas a leucina e a lisina são exclusivamente cetogênicas (Figura 23.22). A isoleucina, a fenilalanina, o triptofano e a tirosina são tanto cetogênicos quanto glicogênicos. Alguns de seus átomos de carbono emergem na acetil-CoA ou acetoacetil-CoA, enquanto outros aparecem em precursores potenciais da glicose. Os outros 14 aminoácidos são classificados como exclusivamente glicogênicos. Essa classificação não é aceita universalmente, visto que são aplicados diferentes critérios quantitativos. O fato de um aminoácido ser considerado glicogênico, cetogênico, ou ambos, depende, em parte, do olho do espectador, embora a maioria dos carbonos dos aminoácidos termine claramente na glicose ou no glicogênio. Identificaremos as vias de degradação pelo ponto de entrada no metabolismo.

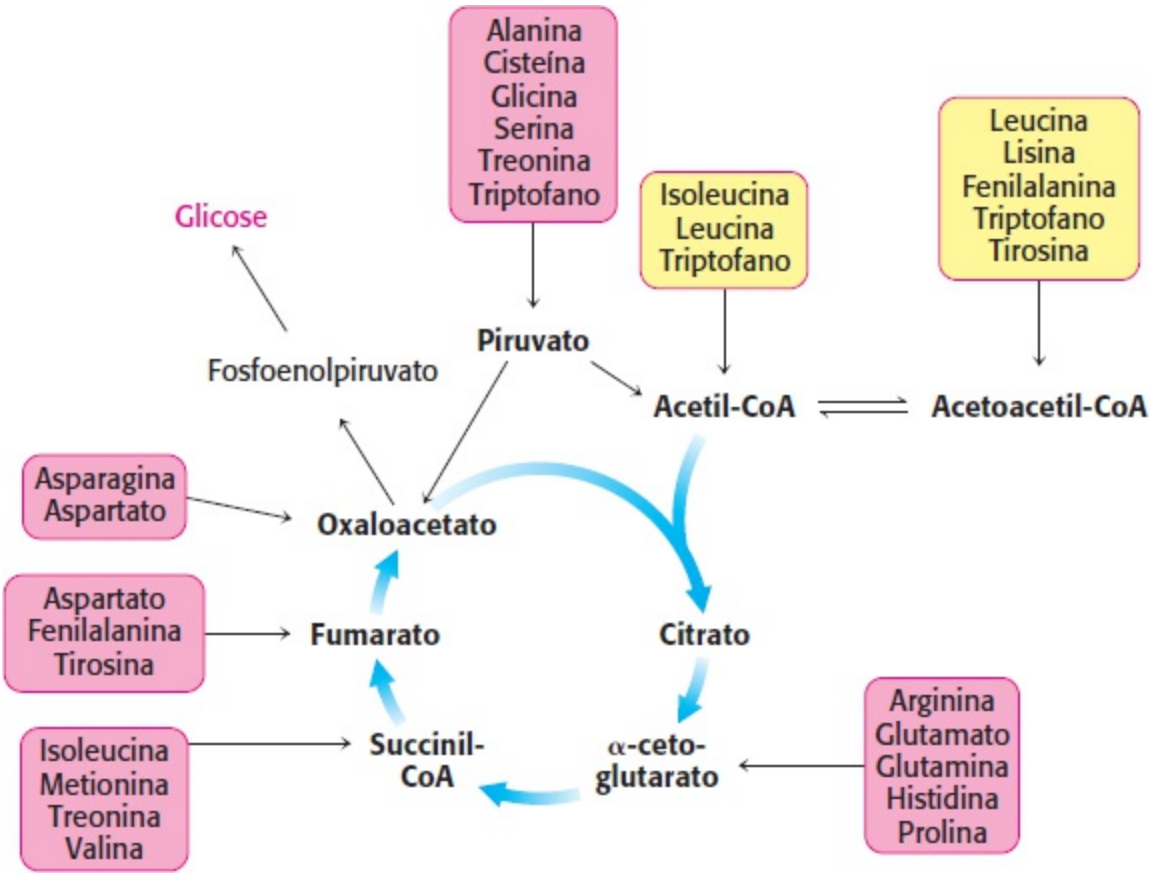


Figura 23.22 Destinos dos esqueletos de carbono dos aminoácidos. Os aminoácidos glicogênicos são mostrados em vermelho, e os aminoácidos cetogênicos, em amarelo. Vários aminoácidos são tanto glicogênicos quanto cetogênicos.

O piruvato é um ponto de entrada no metabolismo para diversos aminoácidos

O piruvato é o ponto de entrada dos aminoácidos de três carbonos – alanina, serina e cisteína – no fluxo metabólico principal (Figura 23.23). A transaminação da alanina produz diretamente piruvato.

$$\text{Alanina} + \alpha\text{-cetoglutarato} \rightleftharpoons \text{piruvato} + \text{glutamato}$$

Conforme assinalado anteriormente, o glutamato sofre então desaminação oxidativa, produzindo NH_4^+ e regenerando α-cetoglutarato. A soma dessas reações é

$$\text{Alanina} + NAD(P)^+ + H_2O \rightarrow \text{piruvato} + NH_4^+ + NAD(P)H + H^+$$

Outra reação simples na degradação de aminoácidos é a *desaminação da serina a piruvato pela serina desidratase* (p. 688).

$$\text{Serina} \rightarrow \text{piruvato} + NH_4^+$$

A cisteína pode ser convertida em piruvato por diversas vias, com o átomo de enxofre aparecendo no H_2S, SCN^- ou SO_3^{2-}.

Os átomos de carbono de três outros aminoácidos podem ser convertidos em piruvato. A *glicina* pode ser convertida em serina pela adição enzimática de um grupo hidroximetila, ou pode ser clivada para produzir CO_2, NH_4^+ e uma unidade monocarbonada ativada. A *treonina* pode dar origem a piruvato por meio do intermediário 2-amino-3-cetobutirato. Três átomos de carbono do *triptofano* podem emergir na alanina, que pode ser convertida em piruvato.

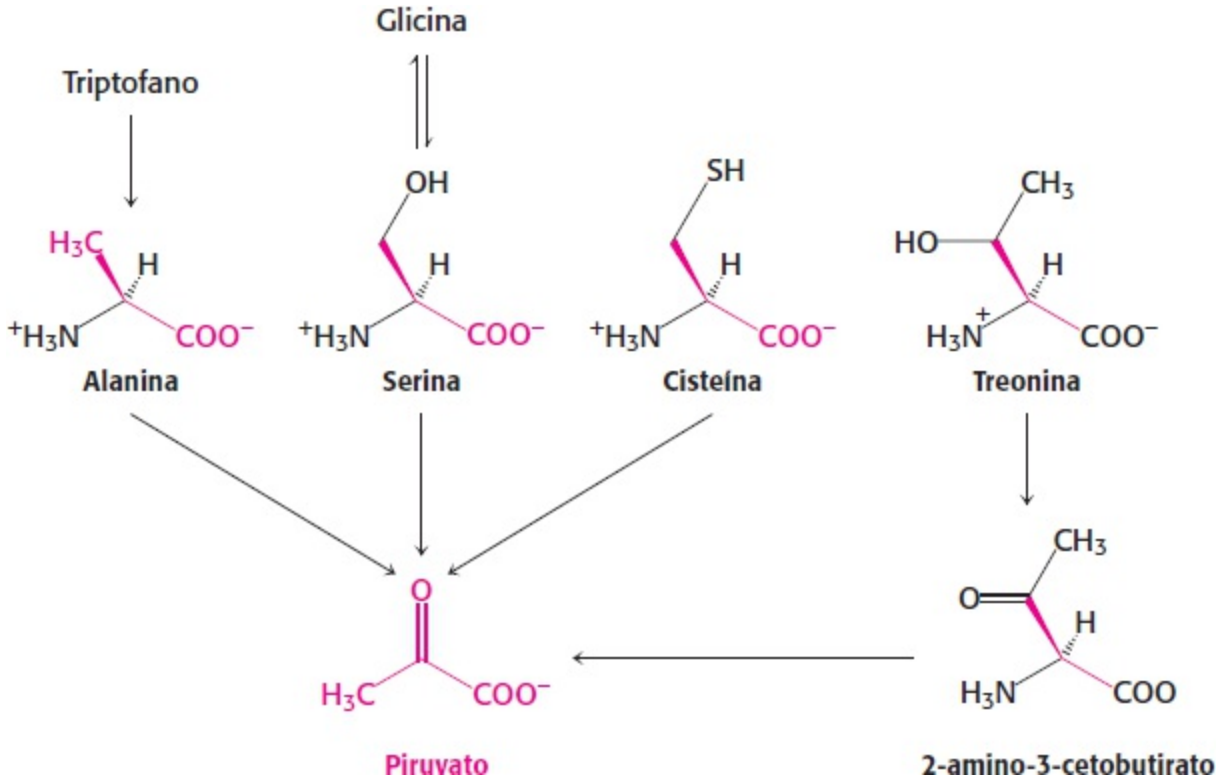


Figura 23.23 Formação de piruvato a partir de aminoácidos. O piruvato é o ponto de entrada da alanina, serina, cisteína, glicina, treonina e triptofano.

O oxaloacetato é um ponto de entrada no metabolismo para o aspartato e a asparigina

O aspartato e a asparigina são convertidos em oxaloacetato, um intermediário do ciclo do ácido do cítrico. O *aspartato*, um aminoácido de quatro carbonos, é *transaminado* diretamente em *oxaloacetato*.

$$\text{Aspartato} + \alpha\text{-cetoglutarato} \leftrightharpoons \text{oxaloacetato} + \text{glutamato}$$

A *asparagina* é hidrolisada pela *asparaginase* a NH_4^+ e aspartato que, em seguida, é transaminado.

Convém lembrar que o aspartato também pode ser convertido em *fumarato* pelo ciclo da ureia (ver Figura 23.18). O fumarato é um ponto de entrada para a metade dos átomos de carbono da tirosina e da fenilalanina, conforme discutido adiante.

O α-cetoglutarato é um ponto de entrada no metabolismo para os aminoácidos de cinco carbonos

Os esqueletos de carbono de vários aminoácidos de cinco carbonos entram no ciclo do ácido cítrico no α-*cetoglutarato*. Esses aminoácidos são inicialmente convertidos em glutamato, que, em seguida, sofre desaminação oxidativa pela glutamato desidrogenase, produzindo α-cetoglutarato (Figura 23.24).

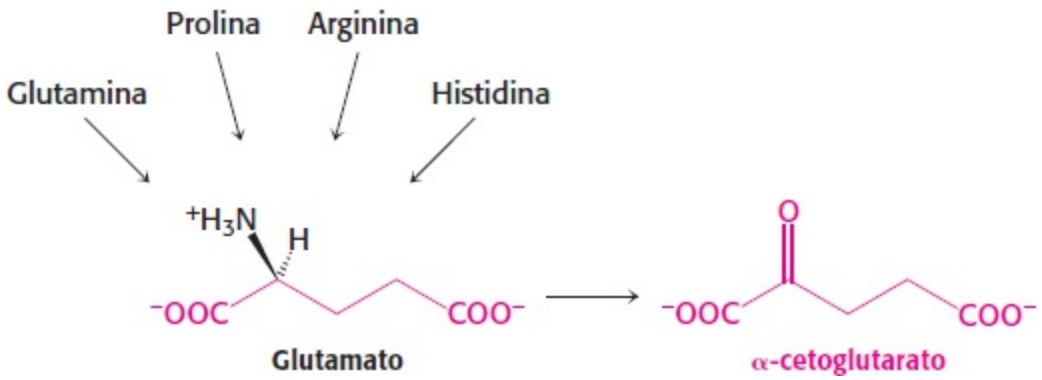


Figura 23.24 Formação do α-cetoglutarato a partir de aminoácidos. O α-cetoglutarato é o ponto de entrada de vários aminoácidos de cinco carbonos, que são inicialmente convertidos em glutamato.

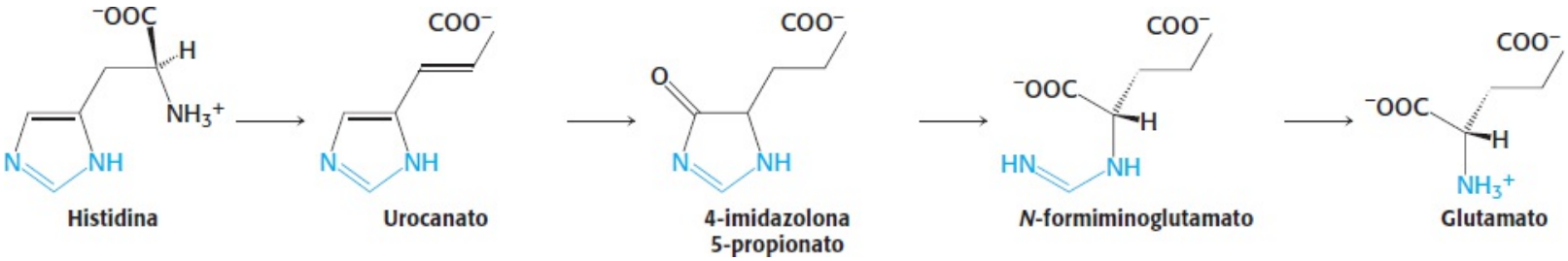


Figura 23.25 Degradação da histidina. Conversão da histidina em glutamato.

A *histidina* é convertida em 4-imidazolona 5-propionato (Figura 23.25). A ligação amida no anel desse intermediário é hidrolisada ao derivado *N*-forminino do glutamato que, a seguir, é convertido em glutamato pela transferência de seu grupo forminino para o tetra-hidrofolato, um carreador de unidades monocarbonadas ativadas (ver Figura 24.9).

A *glutamina* é hidrolisada a glutamato e NH_4^+ pela *glutaminase*. A prolina e a *arginina* são convertidas em glutamato γ-semialdeído, que é então oxidado a glutamato (Figura 23.26).

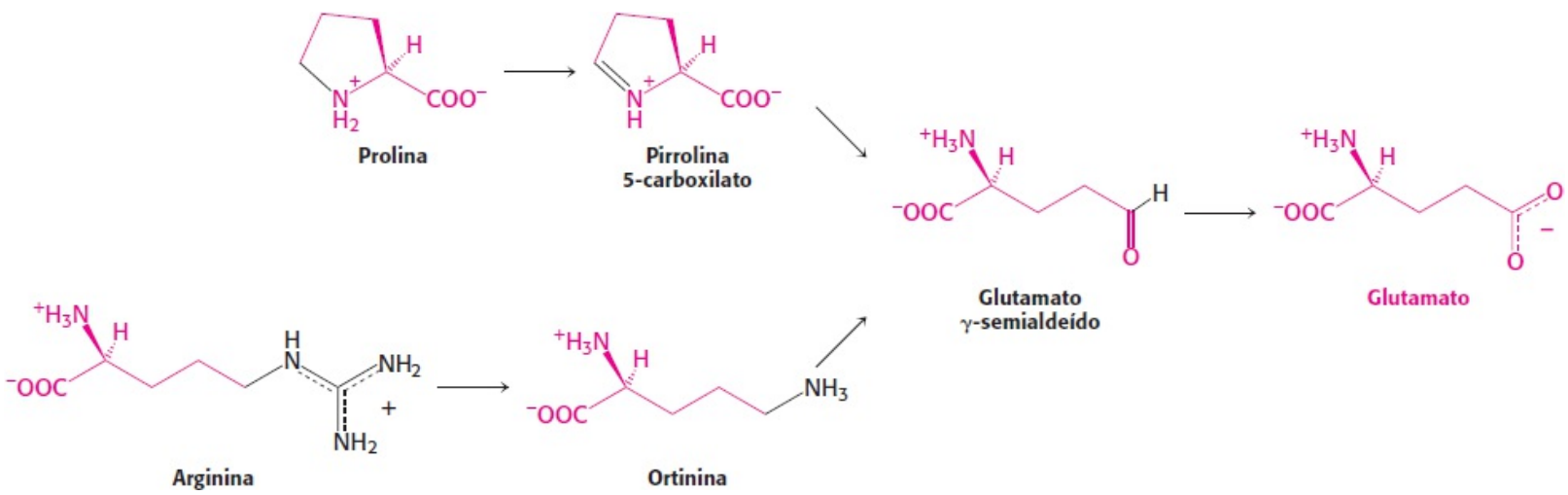


Figura 23.26 Formação do glutamato. Conversão da prolina e da arginina em glutamato.

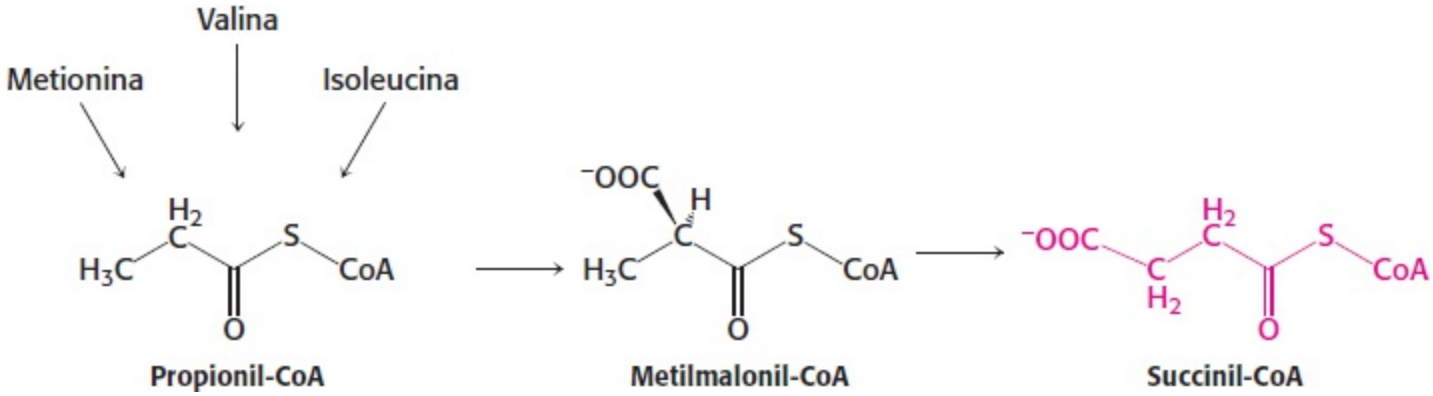


Figura 23.27 Formação da succinil-CoA. Conversão da metionina, isoleucina e valina em succinil-CoA.

A succinil coenzima A é um ponto de entrada para diversos aminoácidos apolares

A succinil-CoA é um ponto de entrada para alguns dos átomos de carbono da metionina, isoleucina e valina. A propionil-CoA e, em seguida, a metilmalonil-CoA são intermediárias na degradação desses três aminoácidos apolares (Figura 23.27). O mecanismo da interconversão entre propionil-CoA e metilmalonil-CoA foi apresentado na Seção 22.3. Essa via da propionil-CoA para a succinil-CoA também é utilizada na oxidação de ácidos graxos que apresentam um número ímpar de átomos de carbono (Seção 22.3).

A degradação da metionina exige a formação de um doador de metila essencial, a *S*-adenosilmetionina

A metionina é convertida em succinil-CoA em nove etapas (Figura 23.28). A primeira etapa consiste na adenilação da metionina para formar a S-*adenosilmetionina* (SAM), um doador de metila comum na célula (Seção 24.2). A perda dos grupos metila e adenosila produz a homocisteína, que é finalmente processada em α-*cetobutirato*. Esse α-cetoácido sofre descarboxilação oxidativa pelo complexo α-cetoácido desidrogenase, a *propionil-CoA*, que é processada em *succinil-CoA*, conforme descrito na Seção 22.3.

Os aminoácidos de cadeia ramificada produzem acetil-CoA, acetoacetato e propionil-CoA

Os aminoácidos de cadeia ramificada são degradados por reações com as quais já nos deparamos no

ciclo do ácido cítrico e na oxidação dos ácidos graxos. A leucina é transaminada ao α-cetoácido correspondente, o α-*cetoisocaproato*. Esse α-cetoácido sofre *descarboxilação oxidativa a isovaleril-CoA* pelo *complexo desidrogenase dos α-cetoácidos de cadeia ramificada.*

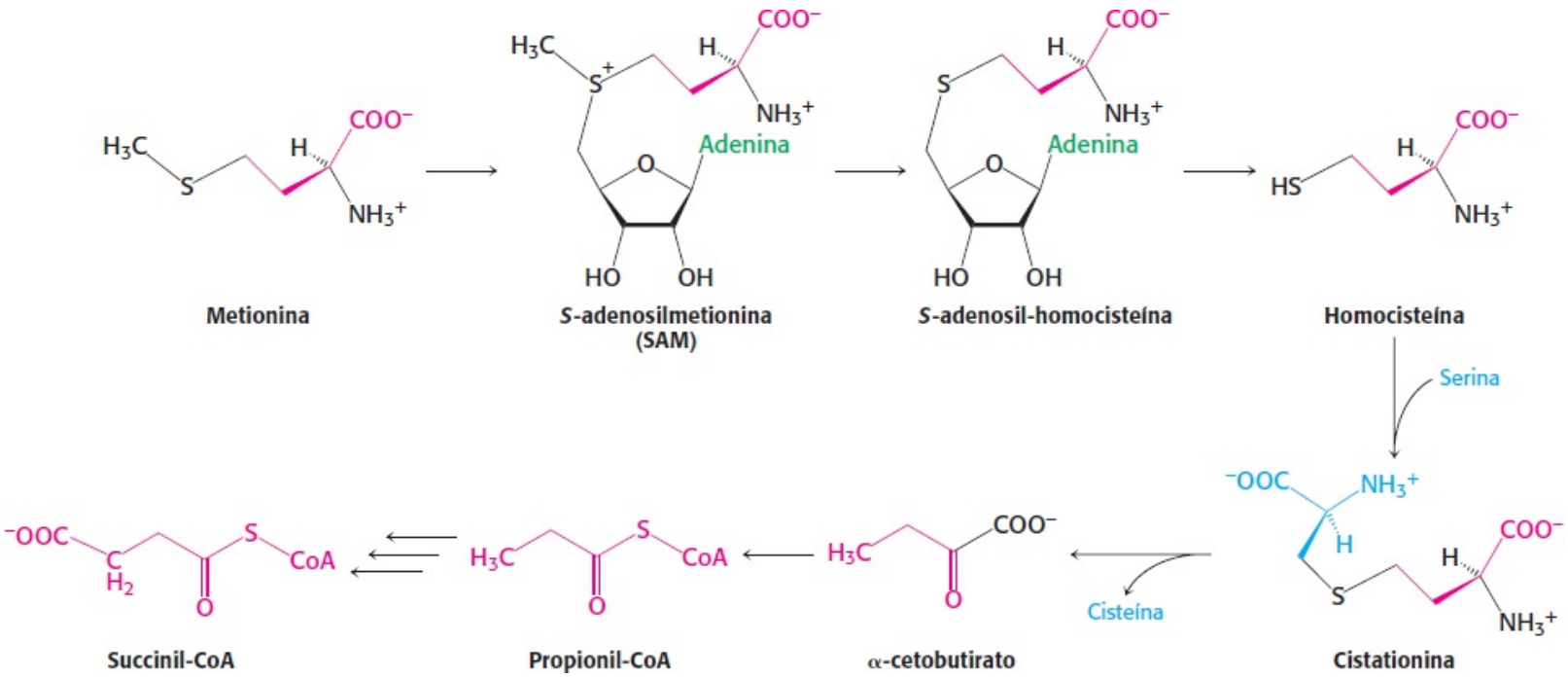
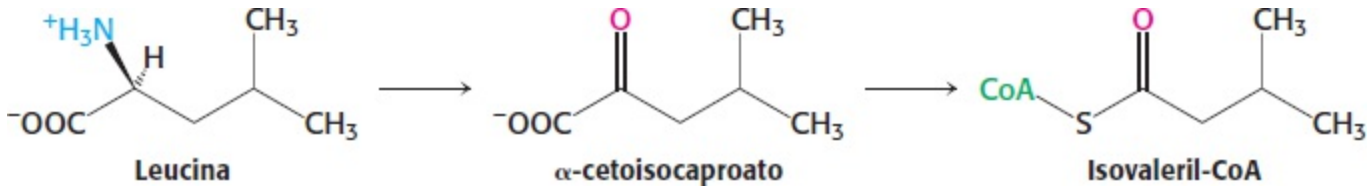
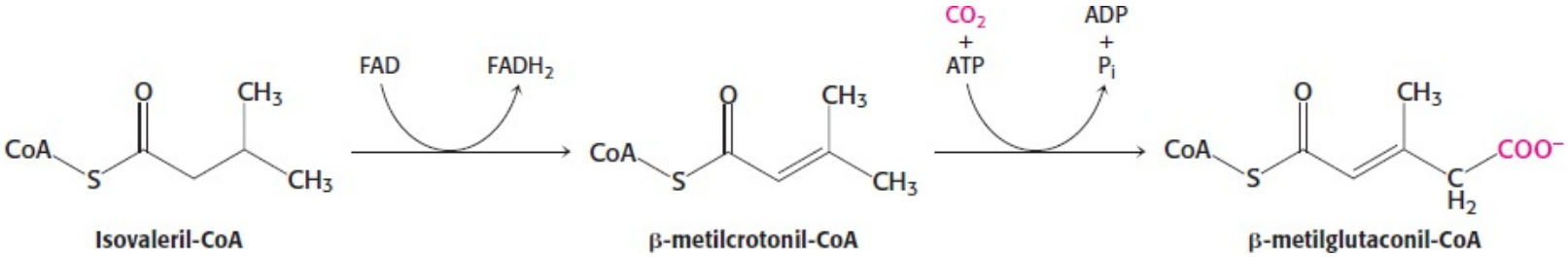


Figura 23.28 Metabolismo da metionina. Via para conversão da metionina em succinil-CoA. A *S*-adenosilmetionina, que é formada ao longo dessa via, é uma molécula importante para a transferência de grupos metila.

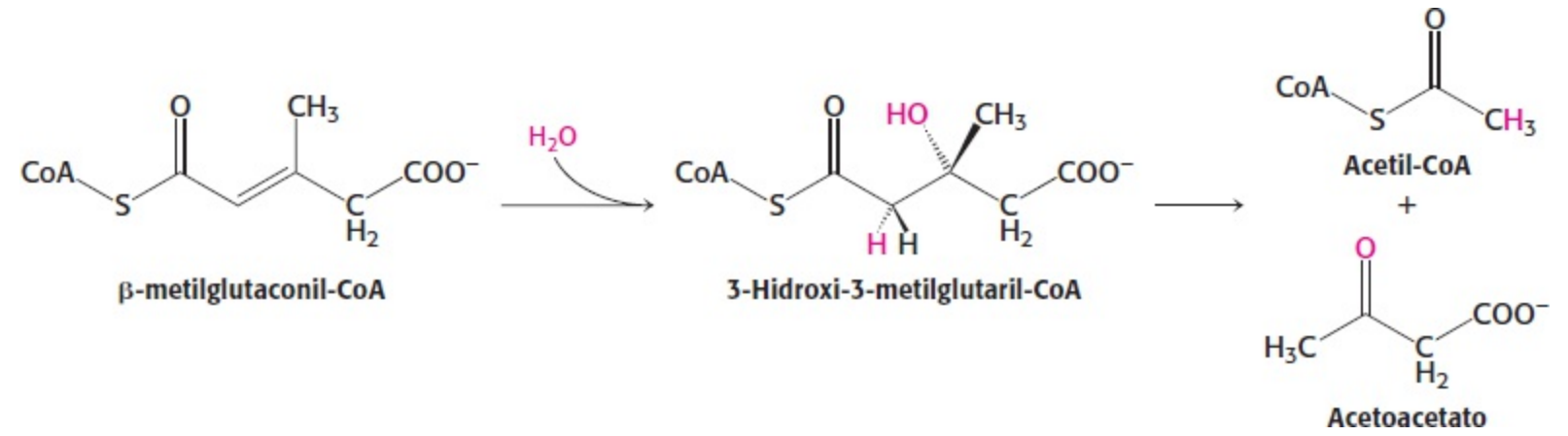


Os α-cetoácidos de valina e isoleucina, os outros dois aminoácidos alifáticos de cadeia ramificada, também são substratos (assim como o α-cetobutirato derivado da metionina). A descarboxilação oxidativa desses α-cetoácidos é análoga à do piruvato a acetil-CoA e à do α-cetoglutarato a succinil-CoA. A desidrogenase de α-cetoácidos de cadeia ramificada, um complexo multienzimático, é um homólogo da piruvato desidrogenase (Seção 17.1) e da α-cetoglutarato desidrogenase (Seção 17.2). Com efeito, os componentes E3 dessas enzimas, que regeneram a forma oxidada da lipoamida, são idênticos.

A isovaleril-CoA derivada da leucina é *desidrogenada*, produzindo β-*metilcrotonil-CoA*. Essa oxidação é catalisada pela *isovaleril-CoA desidrogenase*. O aceptor de hidrogênio é o FAD, como na reação análoga na oxidação de ácidos graxos que é catalisada pela acil-CoA desidrogenase. Em seguida, ocorre formação de β-*metilglutaconil-CoA* pela *carboxilação* da β-metilcrotonil-CoA à custa da hidrólise de uma molécula de ATP. Como seria de esperar, o mecanismo de carboxilação da β-metilcrotonil-CoA carboxilase assemelha-se ao da piruvato carboxilase e da acetil-CoA carboxilase.



A β-metilglutaconil-CoA é então *hidratada* para formar *3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA*, que é clivada em acetil-CoA e *acetoacetato*. Essa reação já foi discutida na formação dos corpos cetônicos a partir de ácidos graxos (Seção 22.3).

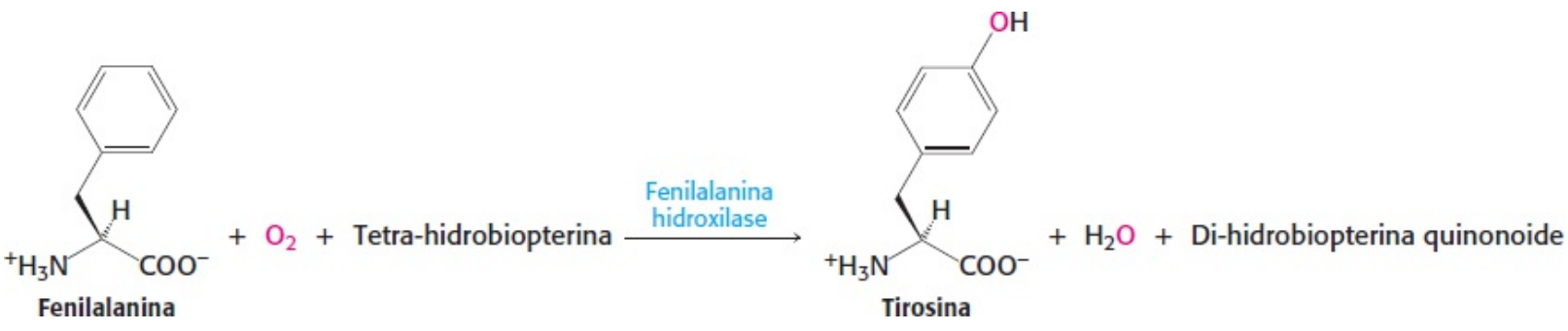


As vias de degradação da valina e da isoleucina assemelham-se àquela da leucina. Após transaminação e descarboxilação oxidativa para produzir um derivado de CoA, as reações subsequentes são iguais às da oxidação de ácidos graxos. A isoleucina produz acetil-CoA e propionil-CoA, enquanto a valina origina CO_2 e propionil-CoA. A degradação da leucina, da valina e da isoleucina validam um comentário feito no Capítulo 15: a quantidade de reações no metabolismo é grande, porém o número de *tipos* de reações é relativamente pequeno. A degradação da leucina, da valina e da isoleucina fornece uma notável ilustração da simplicidade e do refinamento inerentes ao metabolismo.

As oxigenases são necessárias para a degradação dos aminoácidos aromáticos

A degradação dos aminoácidos aromáticos origina os intermediários comuns acetoacetato, fumarato e piruvato. A via de degradação não é direta como a dos aminoácidos anteriormente discutidos. Para os aminoácidos aromáticos, *o oxigênio molecular é utilizado para romper um anel aromático.*

A degradação da fenilalanina começa com a sua hidroxilação a tirosina, uma reação catalisada pela *fenilalanina hidroxilase*. Essa enzima é denominada *mono-oxigenase* (ou *oxigenase de função mista*), visto que *um átomo de O_2* aparece no produto, e o outro, na H_2O.



O redutor nessa reação é a *tetra-hidrobiopterina*, um carreador de elétrons que ainda não foi discutido e que se origina do cofator *biopterina*. Como a biopterina é sintetizada no organismo, não se trata de uma vitamina. A tetra-hidrobiopterina é inicialmente formada pela redução da di-hidrobiopterina pelo NADPH, em uma reação catalisada pela *di-hidrofolato redutase* (Figura 23.29). A forma quinonoide da di-hidrobiopterina é produzida na hidroxilação da fenilalanina. É reduzida de volta à tetra-hidrobiopterina pelo NADPH, em uma reação catalisada pela *di-hidropteridina redutase*. A soma das reações catalisadas pela fenilalanina hidroxilase e di-hidropteridina redutase é

$$\text{Fenilalanina} + O_2 + \text{NADPH} + H^+ \rightarrow \text{tirosina} + \text{NADP+} + H_2O$$

Observe que essas reações também podem ser usadas na síntese de tirosina a partir da fenilalanina.

A etapa seguinte na degradação da fenilalanina e tirosina é a transaminação da tirosina a p-*hidroxifenilpiruvato* (Figura 23.30). Em seguida, esse α-cetoácido reage com O_2 formando *homogentisato*. A enzima que catalisa essa reação complexa, a p-*hidroxifenilpiruvato hidroxilase*, é denominada *dioxigenase*, visto que ambos os átomos de O_2 são incorporados ao produto, um no anel e o outro no grupo carboxila. O anel aromático do homogentisato é então clivado pelo O_2, produzindo 4-maleilacetoacetato. Essa reação é catalisada pela *homogentisato oxidase*, uma outra dioxigenase. Em seguida, o 4-maleilacetoacetato é isomerizado a 4-fumaril- acetoacetato por uma enzima que utiliza a glutationa como cofator. Por fim, o 4-fumaril-acetoacetato é hidrolisado a *fumarato* e *acetoacetato*.

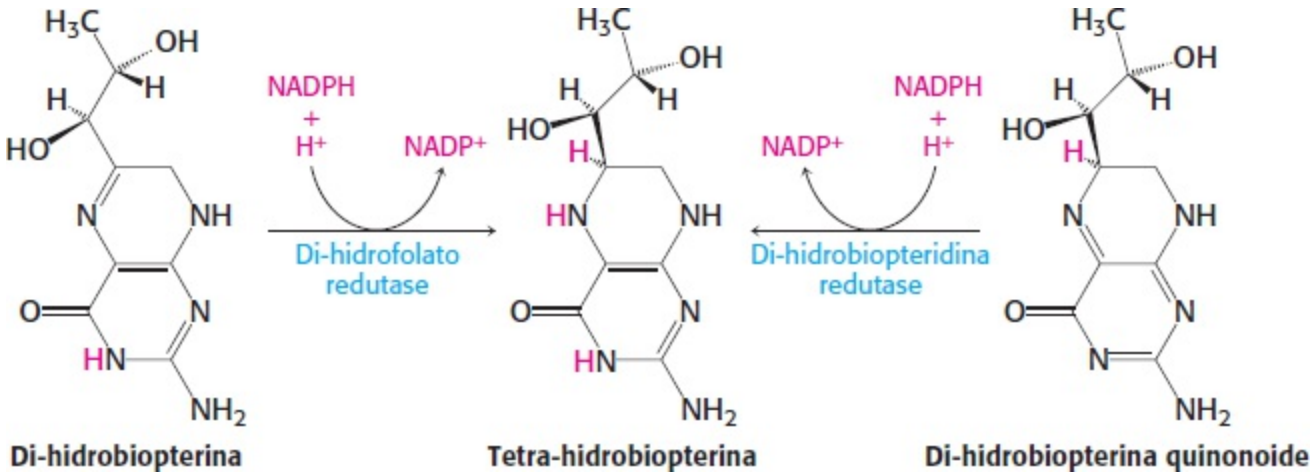


Figura 23.29 Formação da tetra-hidrobiopterina, um importante carreador de elétron. A tetra-hidrobiopterina pode ser formada pela redução de uma das duas formas de di-hidrobiopterina.

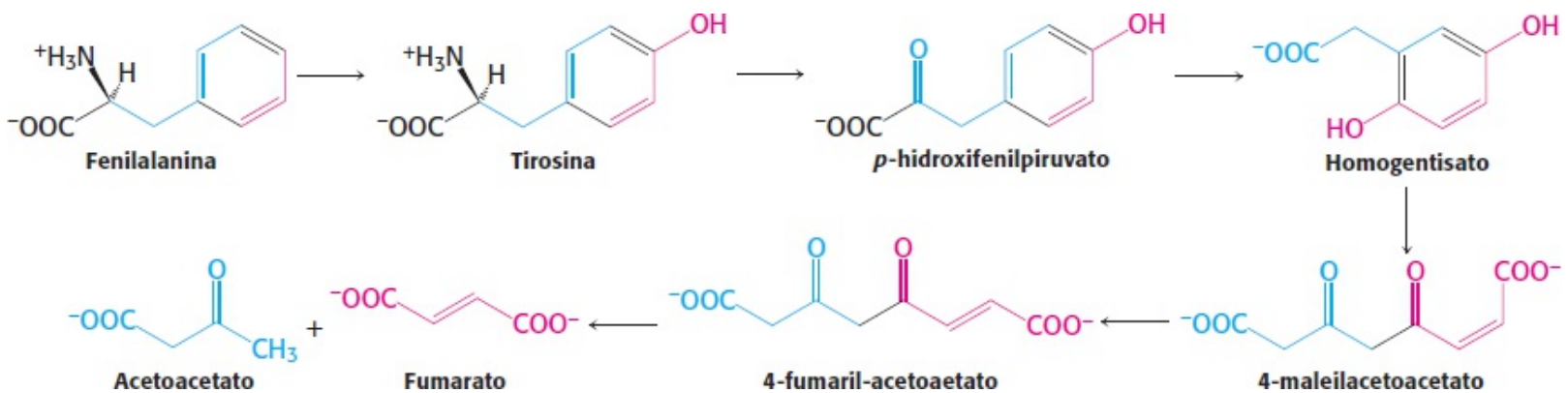


Figura 23.30 Degradação de fenilalanina e da tirosina. A via para a conversão da fenilalanina para acetoacetato e

fumarato.

A degradação do triptofano exige a presença de varias oxigenases (Figura 23.31). A triptofano 2,3-dioxigenase cliva o anel pirrol, e a cinureinina 3-mono-oxigenase hidroxila o anel benzênico remanescente, em uma reação semelhante à hidroxilação da fenilalanina para formar tirosina. A alanina é removida e o 3-hidroxiantranilato é clivado por outra dioxigenase e subsequentemente processado a acetoacetil-CoA. *Quase todas as clivagens de anéis aromáticos nos sistemas biológicos são catalisadas por dioxigenases*, uma classe de enzimas descoberta por Osamu Hayaishi. Os sítios ativos dessas enzimas contêm ferro, que não faz parte do heme nem de um grupo ferro-enxofre.

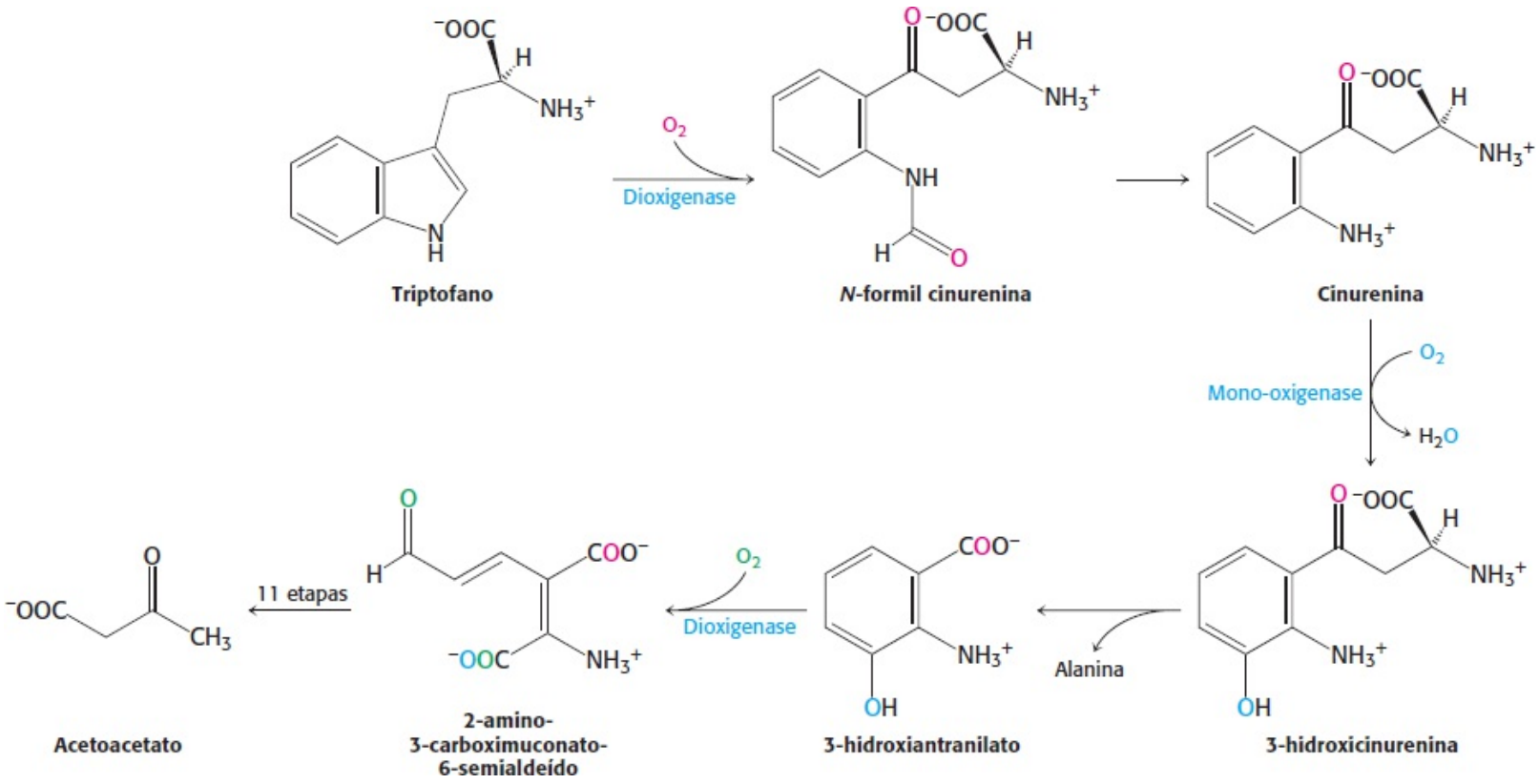
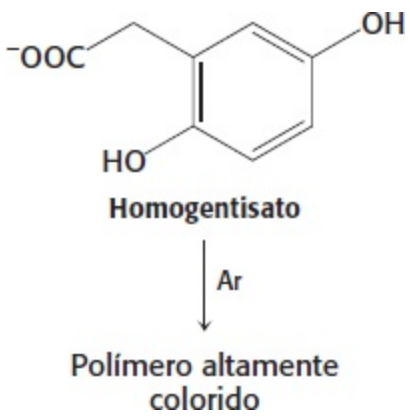


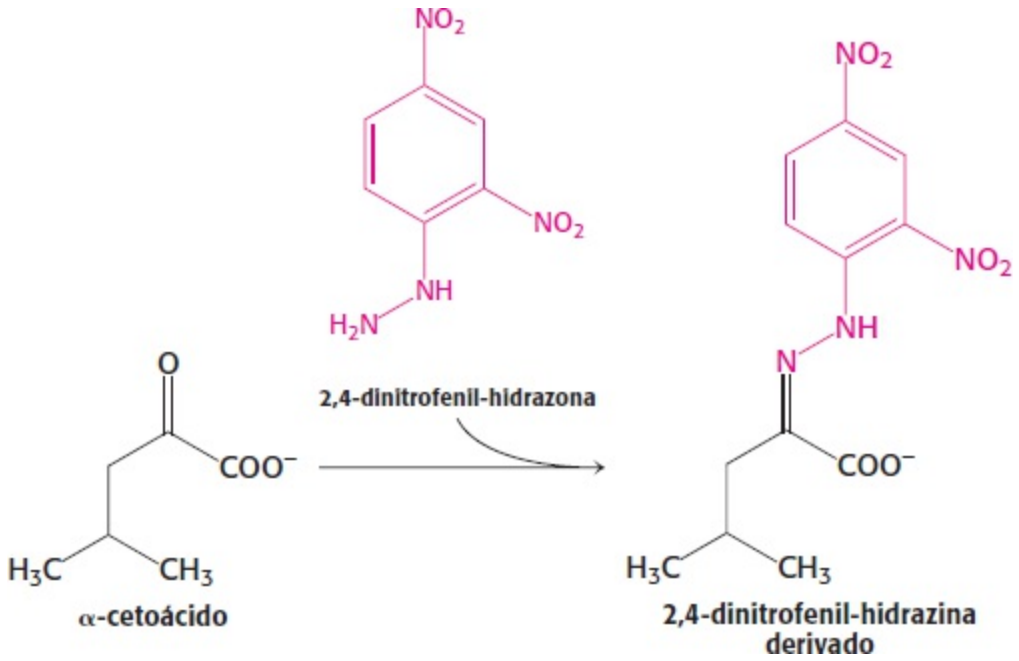
Figura 23.31 Degradação do triptofano. Via de conversão do triptofano em alanina e acetoacetato.

23.6 Os erros inatos do metabolismo podem comprometer a degradação dos aminoácidos

Os erros no metabolismo de aminoácidos forneceram alguns dos primeiros exemplos de defeitos bioquímicos ligados a condições patológicas. Por exemplo, a *alcaptonúria* é um distúrbio metabólico hereditário causado pela ausência da homogentisato oxidase. Em 1902, Archibald Garrod mostrou que a alcaptonúria é transmitida como caráter mendeliano recessivo simples. Além disso, ele reconheceu que o homogentisato é um intermediário normal na degradação da fenilalanina e da tirosina (ver Figura 23.30) e que ele se acumula na alcaptonúria, devido ao bloqueio de sua degradação. Concluiu que "a ruptura do anel benzênico no metabolismo normal resulta do trabalho de uma enzima especial, que falta na alcaptonúria congênita." O homogentisato acumula-se e é excretado na urina, que escurece em repouso, visto que o homogentisato é oxidado e polimerizado a uma substância semelhante à melanina.

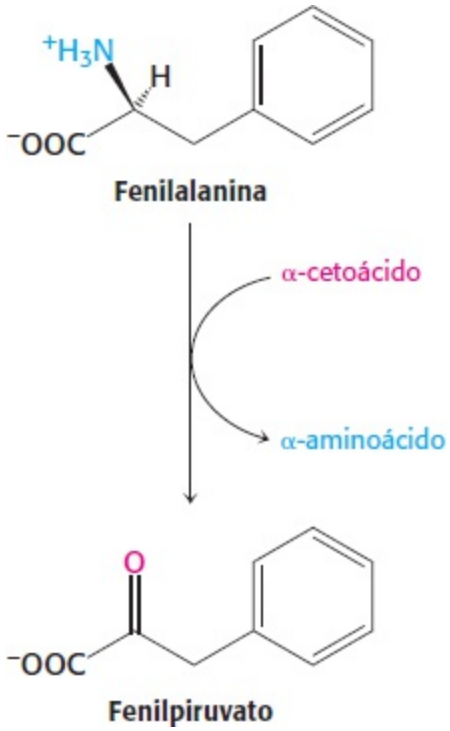


Embora a alcaptonúria seja uma condição relativamente inócua, isso não é o caso de outros erros do metabolismo de aminoácidos. Na *doença da urina* do xarope de bordo (leucinose), a descarboxilação oxidativa dos α-cetoácidos derivados da valina, da isoleucina e da leucina é bloqueada por causa da ausência ou deficiência da desidrogenase de cadeias ramificadas. Por conseguinte, os níveis desses α-cetoácidos e dos aminoácidos de cadeia ramificada dos quais derivam estão acentuadamente elevados tanto no sangue quanto na urina. A urina desses pacientes tem odor de xarope de bordo – o que explica o nome da doença (também denominada *cetoacidúria de cadeia ramificada*). A doença da urina do xarope de bordo resulta habitualmente em retardo mental e físico, a não ser que o paciente receba uma alimentação com baixo teor de valina, isoleucina e leucina no início da vida. A doença pode ser prontamente detectada em recém-nascidos pela triagem de amostras de urina com 2,4-dinitrofenil-hidrazina, que reage com os α-cetoácidos formando derivados 2,4-dinitrofenil-hidrazona. Pode-se estabelecer um diagnóstico definitivo por espectrometria de massa.



A *fenilcetonúria* é, talvez, a mais bem conhecida das doenças do metabolismo de aminoácidos. É causada pela *ausência ou deficiência de fenilalanina hidroxilase* ou, mais raramente, de seu cofator tetra-hidrobiopterina. *A fenilalanina acumula-se em todos os fluidos corporais, visto que ela não pode ser convertida em tirosina*. Normalmente, três quartos das moléculas de fenilalanina são convertidos em tirosina, e o outro quarto é incorporado em proteínas. Como a via de efluxo principal está bloqueada na fenilcetonúria, os níveis sanguíneos de fenilalanina tipicamente são pelo menos 20

vezes mais altos do que os níveis observados em indivíduos normais. Os destinos secundários da fenilalanina em pessoas normais, como a formação de fenilpiruvato, passam a constituir os principais destinos em indivíduos com fenilcetonúria. Com efeito, a descrição inicial da fenilcetonúria, em 1934, foi feita pela observação da reação do fenilpiruvato na urina de indivíduos fenilcetonúricos com $FeCl_3$, que torna a urina verde-oliva.



Quase todos os indivíduos fenilcetonúricos não tratados apresentam grave retardo mental. Com efeito, cerca de 1% dos pacientes em instituições mentais apresenta fenilcetonúria. O peso cerebral desses indivíduos é menor do que o normal, a mielinização dos nervos é deficiente, e os reflexos são hiperativos. A expectativa de vida de indivíduos fenilcetonúricos não tratados é drasticamente reduzida. Metade morre em torno dos 20 anos de idade, e três quartos, em torno dos 30 anos. *A base bioquímica do retardo mental continua sendo um enigma.*

Os indivíduos com fenilcetonúria parecem normais ao nascer, porém tornam-se gravemente defeituosos com 1 ano de idade, se não forem tratados. O tratamento para a fenilcetonúria consiste em uma *alimentação pobre em fenilalanina,* suplementada com tirosina, visto que a tirosina é normalmente sintetizada a partir da fenilalanina. A meta é fornecer uma quantidade de fenilalanina exatamente suficiente para atender às necessidades para o crescimento e reposição. As proteínas que apresentam baixo teor de fenilalanina, como a caseína do leite, são hidrolisadas, e a fenilalanina é removida por adsorção. Deve-se iniciar uma alimentação pobre em fenilalanina muito cedo após o nascimento, a fim de evitar a ocorrência de lesão cerebral irreversível. Em um estudo, o QI médio de fenilcetonúricos tratados dentro de poucas semanas após o nascimento foi de 93; um grupo-controle tratado a partir de 1 ano de idade teve um QI médio de 53.

O diagnóstico precoce de fenilcetonúria é essencial e tem sido estabelecido por programas de triagem em massa. O nível de fenilalanina no sangue constitui o critério preferido de diagnóstico, visto que é mais sensível e confiável do que o teste de $FeCl_3$. O diagnóstico pré-natal de fenilcetonúria com sondas de DNA tornou-se exequível, visto que o gene foi clonado, e foram descobertos os locais exatos de muitas mutações na proteína. Curiosamente, enquanto algumas mutações reduzem a atividade da enzima, outras diminuem a sua concentração. Estas últimas

mutações levam à degradação da enzima, pelo menos em parte, pela via de ubiquitina-proteassoma (Seção 23.2).

A incidência da fenilcetonúria é de cerca de 1 a 20.000 recém-nascidos. A doença é herdada como caráter *autossômico recessivo*. Os heterozigotos, que constituem cerca de 1,5% de uma população típica, parecem normais. Os portadores do gene da fenilcetonúria apresentam níveis reduzidos de fenilalanina hidroxilase, conforme indicado por um nível aumentado de fenilalanina no sangue. Todavia, esse critério não é absoluto, devido a uma superposição, em certo grau, dos níveis sanguíneos de fenilalanina nos indivíduos portadores e normais. A medição da cinética de desaparecimento da fenilalanina administrada por via intravenosa fornece um teste mais definitivo para portador. É preciso assinalar que a presença de um nível sanguíneo elevado de fenilalanina em uma gestante pode resultar em desenvolvimento anormal do feto. Isso fornece um notável exemplo das relações maternofetais em nível molecular. A Tabela 23.4 apresenta uma lista com outras doenças do metabolismo do aminoácido.

Tabela 23.4 Erros inatos do metabolismo de aminoácidos.

Doença	Deficiência enzimática	Sintomas
Citrulinemia	Argininossuccinato liase	Letargia, convulsões, redução da tensão muscular
Tirosinemia	Várias enzimas da degradação da tirosina	Fraqueza, automutilação, lesão hepática, retardo mental
Albinismo	Tirosinase	Ausência de pigmentação
Homocistinúria	Cistationina β-sintase	Escoliose, fraqueza muscular, retardo mental, cabelos loiros finos
Hiperlisinemia	α-aminoadípico semialdeído desidrogenase	Convulsões, retardo mental, falta de tônus muscular, ataxia

Resumo

23.1 As proteínas são degradadas a aminoácidos

As proteínas alimentares são digeridas no intestino, produzindo aminoácidos que são transportados por todo o organismo. As proteínas celulares são degradadas a velocidades amplamente variáveis, desde minutos até o tempo de vida do organismo.

23.2 A renovação das proteínas é rigorosamente regulada

A renovação das proteínas celulares é um processo regulado, que exige a atuação de sistemas enzimáticos complexos. As proteínas a serem degradas são conjugadas com ubiquitina, uma pequena proteína conservada, em uma reação impulsionada pela hidrólise do ATP. O sistema de conjugação da ubiquitina é composto de três enzimas distintas. Um grande complexo em forma de barril, denominado proteassoma, digere as proteínas ubiquitinadas. O proteassoma também exige a hidrólise do ATP para funcionar. Os aminoácidos resultantes fornecem uma fonte de precursores para proteínas, bases de nucleotídios e outros compostos nitrogenados.

23.3 A primeira etapa na degradação dos aminoácidos consiste na remoção do nitrogênio

Os aminoácidos em excesso são utilizados como unidades básicas de construção e como energia metabólica. A primeira etapa na sua degradação consiste na remoção de seus grupos α-amino por transaminação a α-cetoácidos. O piridoxal fosfato é a coenzima em todas as aminotransferases e em diversas outras enzimas que catalisam transformações de aminoácidos. O grupo α-amino converge para o α-cetoglutarato, formando glutamato, que, em seguida, sofre desaminação oxidativa pela glutamato desidrogenase, produzindo NH_4^+ e α-cetoglutarato. O NAD^+ ou o $NADP^+$ constituem os aceptores de elétrons nessa reação.

23.4 O íon amônio é convertido em ureia na maioria dos vertebrados terrestres

A primeira etapa na síntese da ureia é a formação de carbamoil fosfato, que é sintetizado a partir de HCO_3^-, NH_3 e duas moléculas de ATP pela carbamoil fosfato sintetase. Em seguida, a ornitina é carbamoilada a citrulina pela ornitina transcarbamoilase. Essas duas reações ocorrem nas mitocôndrias. A citrulina abandona a mitocôndria e condensa-se com o aspartato para formar argininossuccinato, que é clivado a arginina e fumarato. O outro átomo de nitrogênio da ureia provém do aspartato. A ureia é formada pela hidrolise da arginina, que também regenera ornitina.

23.5 Os átomos de carbono dos aminoácidos degradados emergem como intermediários metabólicos importantes

Os átomos de carbono dos aminoácidos degradados são convertidos em piruvato, acetil-CoA, acetoacetato ou em um intermediário do ciclo do ácido cítrico. Os aminoácidos são, em sua maioria, exclusivamente glicogênicos, dois deles são exclusivamente cetogênicos, e alguns são tanto cetogênicos quanto glicogênicos. A alanina, a serina, a cisteína, a glicina, a treonina e o triptofano são degradados em piruvato. A asparagina e o aspartato são convertidos em oxaloacetato. O α-cetoglutarato é o ponto de entrada para o glutamato e quatro aminoácidos (glutamina, histidina, prolina e arginina) que podem ser convertidos em glutamato. A succinil-CoA é o ponto de entrada para alguns dos átomos de carbono de três aminoácidos (metionina, isoleucina e valina) que são degradados por meio do intermediário, metilmalonil-CoA. A leucina é degradada a acetoacetato e acetil-CoA. A degradação da valina e da isoleucina é semelhante à da leucina. Seus derivados α-cetoácidos sofrem descarboxilação oxidativa pela desidrogenase de α-cetoácidos de cadeia ramificada.

Os anéis dos aminoácidos aromáticos são degradados por oxigenases. A fenilalanina hidroxilase, uma mono-oxigenase, utiliza tetra-hidrobiopterina como redutor. Um dos átomos de oxigênio do O_2 emerge na tirosina, enquanto outro aparece na água. As etapas subsequentes na degradação desses aminoácidos aromáticos são catalisadas por dioxigenases, que catalisam a inserção de ambos os átomos do O_2 em produtos orgânicos. Quatro dos átomos de carbono da fenilalanina e da tirosina são convertidos em fumarato, e quatro aparecem no acetoacetato.

23.6 Os erros inatos do metabolismo podem comprometer a degradação dos aminoácidos

Os erros no metabolismo de aminoácidos estiveram na origem de algumas das primeiras

descobertas sobre a correlação entre patologia e bioquímica. A fenilcetonúria é o mais conhecido dos numerosos erros hereditários do metabolismo dos aminoácidos. Essa condição resulta do acúmulo de altos níveis de fenilalanina nos fluidos corporais. Por mecanismos que permanecem desconhecidos, esse acúmulo resulta em retardo mental, a não ser que os indivíduos acometidos recebam uma dieta pobre em fenilalanina imediatamente após o nascimento.

Palavras-chave

aminoácido cetogênico (p. 694)
aminoácido glicogênico (p. 694)
aminotransferase (transaminase) (p. 684)
biopterina (p. 699)
carbamoil fosfato sintetase (p. 689)
ciclo da glicose-alanina (p. 688)
ciclo da ureia (p. 689)
degron (p. 680)
fenilcetonúria (p. 701)
glutamato desidrogenase (p. 684)
N-acetilglutamato (p. 690)
piridoxal fosfato (PLP) (p. 685)
piridoxamina fosfato (PMP) (p. 686)
proteassoma (p. 681)
ubiquitina (p. 679)

Questões

1. *Submetidas a exposição*. As proteínas são desnaturadas pelo ácido existente no estômago. Essa desnaturação faz com que as proteínas se tornem substratos mais apropriados para a proteólise. Explique por que isso ocorre.

2. *Marcação para destruição*. Quais são as etapas necessárias para a fixação da ubiquitina a uma proteína-alvo?

3. *Encontros*. Estabeleça a correspondência entre a descrição da direita e o termo da esquerda.

a. Pepsina
b. Regra do *N*-terminal
c. Ubiquitina
d. Sequência PEST
e. Nucleófilos de treonina
f. Desenovelamento da proteína dependente de ATP
g. Proteassoma

h. Enzima ativadora de ubiquitina

i. Enzima de conjugação de ubiquitina

j. Ubiquitina ligase

1. Exige a presença de um intermediário adenilato
2. Marca uma proteína para destruição
3. Subunidade reguladora 19S
4. Determina a meia-vida de uma proteína
5. Cerne 20S
6. Substrato da ligase
7. Enzima proteolítica do estômago
8. Reconhece a proteína a ser degradada
9. Máquina de degradação de proteína
10. Pro-Glu-Ser-Thr

4. *Energia desperdiçada?* A hidrólise de proteínas é um processo exergônico; contudo, o proteassoma 26S depende da hidrólise do ATP para sua atividade.

(a) Embora não se conheça a função exata da atividade da ATPase, sugira algumas funções prováveis.

(b) Os pequenos peptídios podem ser hidrolisados sem gasto de ATP. Como essa informação concorda com a sua resposta no item *a*?

5. Correspondentes cetônicos. Cite o α-cetoácido que é formado pela transaminação de cada um dos seguintes aminoácidos:

(a) Alanina

(b) Aspartato

(c) Glutamato

(d) Leucina

(e) Fenilalanina

(f) Tirosina

6. *Uma unidade básica de construção versátil*. (a) Escreva uma equação balanceada para a conversão do aspartato em glicose por meio do intermediário, oxaloacetato. Quais enzimas participam nessa transformação? (b) Escreva uma equação balanceada para a conversão do aspartato em oxaloacetato por meio do intermediário fumarato.

7. *Os benefícios da especialização*. O proteassoma dos *archaea* contém 14 subunidades β idênticas ativas, enquanto o proteassoma dos eucariotos tem sete subunidades β distintas. Quais os benefícios potenciais da existência de várias subunidades ativas distintas?

8. *Proponha uma estrutura*. A subunidade 19S do proteassoma contém seis subunidades que são membros da família da AAA de ATPases. Outros membros dessa grande família associamse em homo-hexâmeros com simetria hexagonal. Proponha uma estrutura para as AAA ATPases dentro do proteassoma 19S. Como você poderia testar e aprimorar a sua previsão?

9. *Escoadouros de elétrons efetivos*. O piridoxal fosfato estabiliza intermediários cabaniônicos ao atuar como escoadouro de elétrons. Que outro grupo prostético catalisa reações dessa maneira?

10. *Cooperação*. Como as aminotransferases e a glutamato desidrogenase cooperam no metabolismo do grupo amino dos aminoácidos?

11. *Retirando o nitrogênio*. Quais aminoácidos produzem componentes do ciclo do ácido cítrico e intermediários da glicólise quando desaminados?

12. *Uma reação apenas*. Quais aminoácidos podem ser desaminados diretamente?

13. *Produtos úteis.* Quais são as características comuns dos produtos de degradação dos esqueletos de carbono dos aminoácidos?

14. *Mãos que auxiliam*. Proponha um papel para o átomo de nitrogênio guanidínio carregado positivamente na clivagem do argininossuccinato em arginina e fumarato.

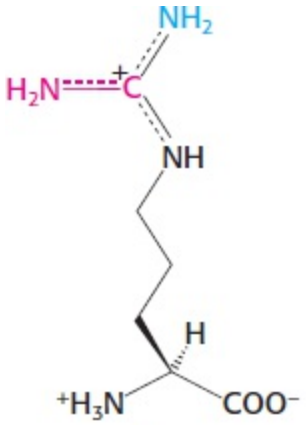
15. *Fontes de nitrogênio*. Quais as fontes bioquímicas imediatas para os dois átomos de nitrogênio na ureia.

16. *Contraparte.* Combine o composto bioquímico da direita com a propriedade apresentada à esquerda.

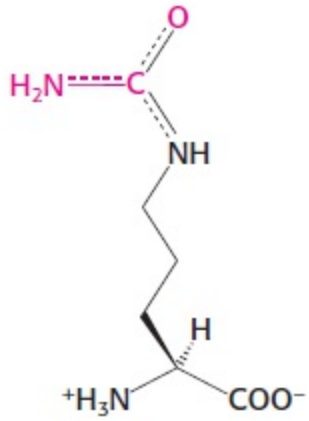
a. Formado(a) a partir de NH_4^+
b. Hidrolisado(a) para produzir ureia
c. Segunda fonte de nitrogênio
d. Reage com aspartato
e. A clivagem produz fumarato
f. Aceita o primeiro nitrogênio
g. Produto final

1. Aspartato
2. Ureia
3. Ornitina
4. Carbamoil fosfato
5. Arginina
6. Citrulina
7. Argininossuccinato

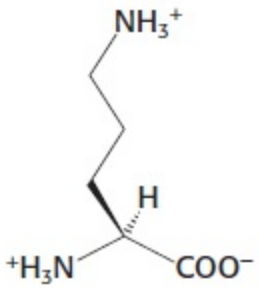
17. *Alinhamento*. Identifique as estruturas A a D e coloqueas na sequência em que aparecem no ciclo da ureia.



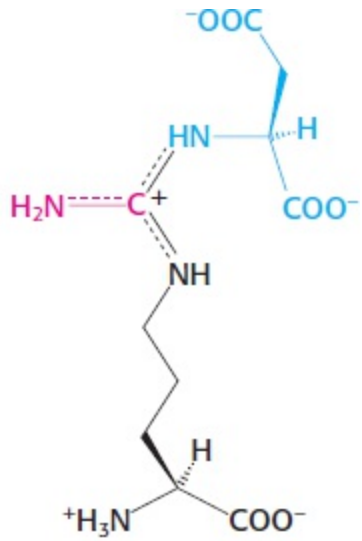
A



B



C

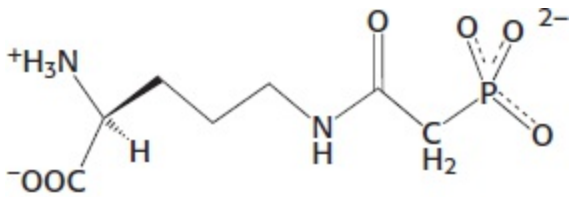


D

18. *Completando o ciclo.* Quatro grupos fosforila de alto potencial de transferência são consumidos na síntese de ureia, de acordo com a estequiometria apresentada na p.691. Nessa reação, o aspartato é convertido em fumarato. Suponha que o fumarato seja convertido em oxaloacetato. Qual a estequiometria resultante da síntese de ureia? Quantos grupos fosforila de alto potencial de transferência são gastos?

19. *Uma boa aposta.* Um amigo aposta uma enorme quantia em dinheiro que você não consegue provar que o ciclo da ureia está ligado ao ciclo do ácido cítrico e a outras vias metabólicas. Você pode arriscar?

20. *Projeto de inibidor*. O composto A foi sintetizado como inibidor potencial de uma enzima do ciclo da ureia. Qual enzima você acha que o composto A poderia inibir?



Composto A

21. *Toxicidade da amônia*. O glutamato é um importante neurotransmissor cujos níveis precisam ser regulados cuidadosamente no cérebro. Explique como a presença de amônia em alta concentração poderia perturbar essa regulação. Como uma alta concentração de amônia poderia alterar o ciclo do

ácido cítrico?

22. *Um diagnóstico preciso*. A urina de um lactente fornece uma reação positiva com 2,4-dinitrofenil-hidrazina. A espectrometria de massa revela níveis sanguíneos anormalmente elevados de piruvato, de α-cetoglutarato e dos α-cetoácidos de valina, isoleucina e leucina. Identifique um provável defeito molecular e proponha um teste definitivo para o seu diagnóstico.

23. *Projeto terapêutico*. Como você trataria um lactente com deficiência de argininossuccinato sintetase? Que moléculas poderiam transportar o nitrogênio para fora do corpo?

24. *Fígado danificado*. Como veremos posteriormente (Capítulo 27), a lesão hepática (cirrose) frequentemente resulta da intoxicação por amônia. Explique por que isso ocorre.

25. *Acidúria argininossuccínica*. A acidúria argininossuccínica é uma condição que surge quando há deficiência da argininossuccinase, uma enzima do ciclo da ureia. O argininossuccinato está presente no sangue e na urina. Sugira como essa condição poderia ser tratada enquanto o nitrogênio continuasse sendo removido do corpo.

26. *Doce risco*. Por que os fenilcetonúricos devem evitar o uso do aspartame, um adoçante artificial? (Dica: o aspartame é o metil-éster de L-aspartil L-fenilalanina.)

27. *Déjà vu*. O *N*-acetilglutamato é necessário como cofator na síntese de carbamoil fosfato. Como o *N*-acetilglutamato poderia ser sintetizado a partir do glutamato?

28. *Balanço nitrogenado negativo*. A deficiência de até mesmo um aminoácido resulta em balanço nitrogenado negativo. Nesse estado, a degradação de proteínas é maior do que a sua síntese, de modo que maior quantidade de nitrogênio é excretada, em comparação com a sua ingestão. Por que a proteína seria degradada se apenas um aminoácido estivesse ausente?

29. *Precursores*. Diferencie os aminoácidos cetogênicos dos aminoácidos glicogênicos.

30. *Estreita relação*. O complexo da piruvato desidrogenase e o complexo da α-cetoglutarato desidrogenase são enzimas de grande tamanho que consistem em três atividades enzimáticas separadas. Quais são os aminoácidos que necessitam de um complexo enzimático relacionado, e qual o nome da enzima?

31. *Linha de abastecimento*. Os esqueletos de carbono dos 20 aminoácidos comuns podem ser degradados em uma quantidade limitada de produtos finais. Quais são os produtos finais e qual a via metabólica onde são comumente encontrados?

Questões sobre mecanismo

32. *Serina desidratase*. Escreva por extenso um mecanismo completo para a conversão da serina em aminoacrilato, catalisada pela serina desidratase.

33. *Serina racemase*. O sistema nervoso contém uma quantidade substancial de D-serina, que é gerada a partir da L-serina pela serina racemase, uma enzima dependente de PLP. Proponha um mecanismo para essa reação. Qual é a constante de equilíbrio para a reação L-serina $\rightleftharpoons$ D-serina?

Questões Integração de capítulos

34. *Duplo dever.* Os sinais de degradação são comumente localizados em regiões da proteína que também facilitam as interações proteína-proteína. Explique por que a coexistência dessas duas funções no mesmo domínio poderia ser útil.

35. *Escolha do combustível*. Dentro de poucos dias após iniciar um jejum, a excreção de nitrogênio acelera, alcançando um nível acima do normal. Depois de algumas semanas, a taxa de excreção de nitrogênio cai para um nível mais baixo e continua nessa baixa velocidade. Entretanto, após a depleção das reservas de gordura, a excreção de nitrogênio aumenta e alcança um nível elevado.

(a) Quais são os eventos que desencadeiam o surto inicial de excreção de nitrogênio?

(b) Por que a excreção de nitrogênio cai depois de várias semanas de jejum?

(c) Explique o aumento da excreção de nitrogênio quando ocorre depleção das reservas de gordura.

36. *Degradação da isoleucina*. A isoleucina é degradada a acetil-CoA e succinil-CoA. Sugira uma sequência plausível de reações, baseada nas reações discutidas no texto, para essa via de degradação.

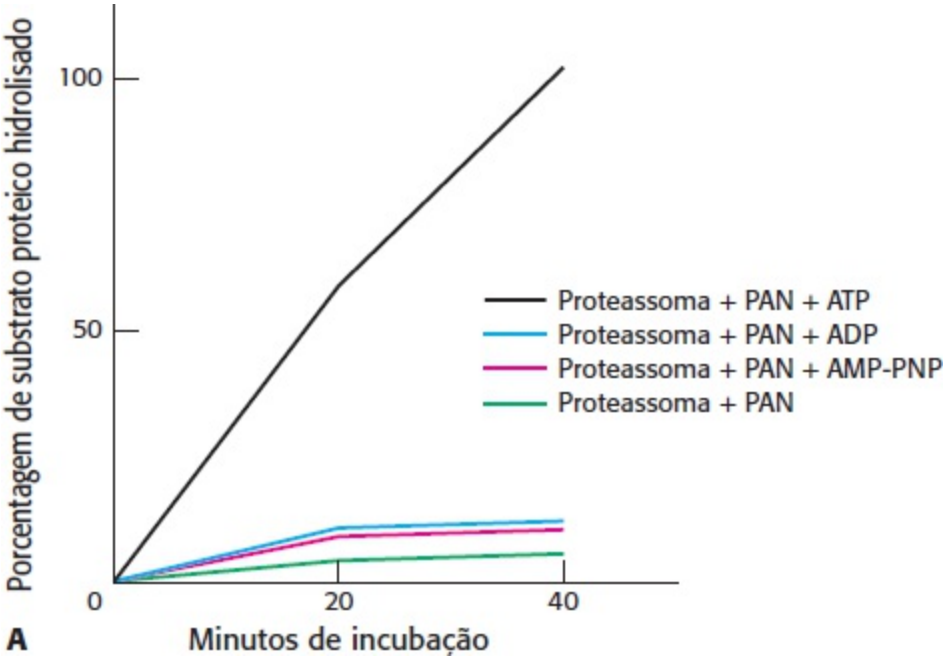
37. *Numerosos papéis*. O piridoxal fosfato é uma coenzima importante em reações de transaminação. Essa coenzima já foi discutida anteriormente, no metabolismo do glicogênio. Qual enzima do metabolismo do glicogênio necessita de piridoxal fosfato e qual a função desempenhada pela coenzima para essa enzima?

38. *Ciclos suficientes para uma corrida*. O ciclo da glicose-alanina lembra o ciclo de Cori, porém pode-se dizer que o ciclo da glicose-alanina é mais eficiente em termos de energia. Explique o motivo.

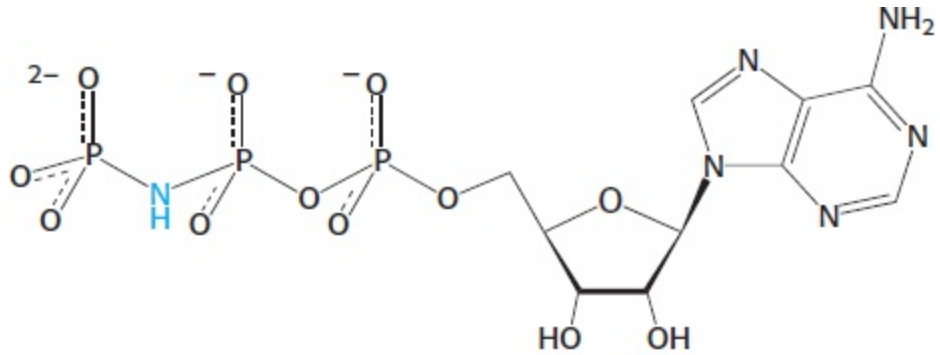
Questão | Interpretação de dados

39. *Outra ajuda prestada*. Nos eucariotos, o componente proteassoma 20S, em associação com o componente 19S, degrada as proteínas ubiquitinadas, com hidrólise de uma molécula de ATP. Os *archaea* carecem de ubiquitina e do proteassoma 26S, porém contêm um proteassoma 20S. Alguns *archaea* também apresentam uma ATPase, que é homóloga às ATPases do componente 19S eucariótico. Essa atividade de ATPase dos *archaea* foi isolada na forma de um complexo de 650 kDa (denominado PAN) do *archaeon Thermoplasma*, e foram realizados experimentos para determinar se o PAN poderia potencializar a atividade do proteassoma 20S do *Thermoplasma*, bem como de outros proteassomas 20S.

A degradação de proteína foi medida em função do tempo e na presença de várias combinações de componente. O Gráfico A mostra os resultados.



A



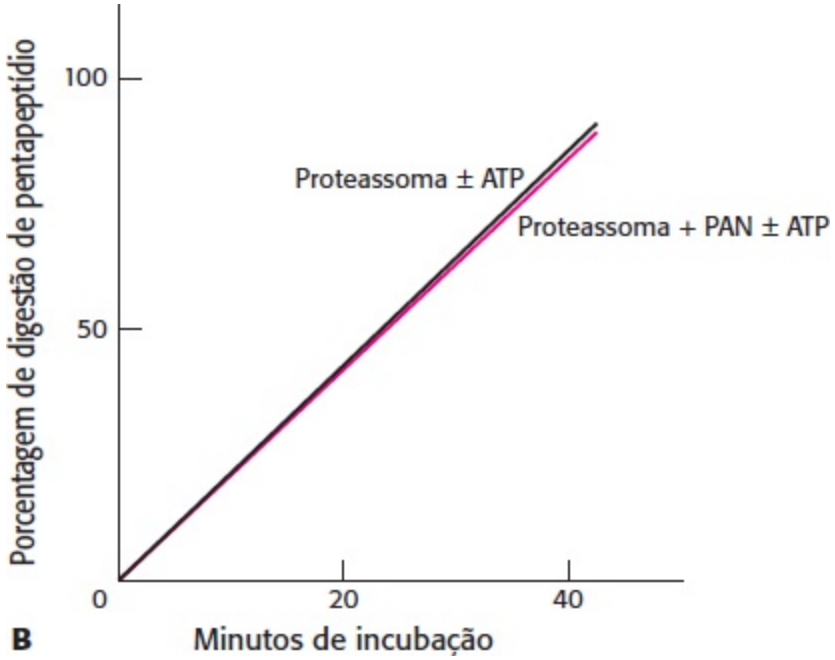
AMP-PNP

(a) Qual é o efeito do PAN sobre a atividade do proteassoma de *archaea* na ausência de nucleotídios?

(b) Qual é o nucleotídio necessário para a digestão de proteínas?

(c) Qual evidência sugere que a hidrólise do ATP, e não apenas a sua presença, é necessária para a digestão?

Foi realizado um experimento semelhante com um pequeno peptídio como substrato para o proteassoma, em lugar de uma proteína. Os resultados obtidos são demonstrados no Gráfico B.



(d) Como as necessidades para a digestão do peptídio diferem daquelas para a digestão da proteína?

(e) Sugira algumas razões para essa diferença.

Foi então examinada a capacidade do PAN do archaeon *Thermoplasma* de sustentar a degradação proteica pelos proteassomas 20S do *archaeon Methanosarcina* e do músculo de coelho.

Porcentagem de digestão de substrato proteico (fonte de proteassoma 20S)

Adições	*Thermoplasma*	*Methanosarcina*	Músculo de coelho
Nenhuma	11	10	10
PAN	8	8	8
PAN + ATP	100	40	30
PAN + ADP	12	9	10

[Dados de P. Zwickl, D. Ng, K. M. Woo, H.-P. Klenk, and A. L. Goldberg. An archaebacterial ATPase, homologous to ATPase in the eukaryotic 26S proteasome, activates protein breakdown by 20S proteasomes. J. Biol. Chem. 274(1999): 26008-26014.]

(f) O PAN do *Thermoplasma* pode aumentar a digestão de proteínas pelos proteassomas de outros organismos?

(g) Qual é o significado da estimulação do proteossoma do músculo de coelho pelo PAN *Thermoplasma*?

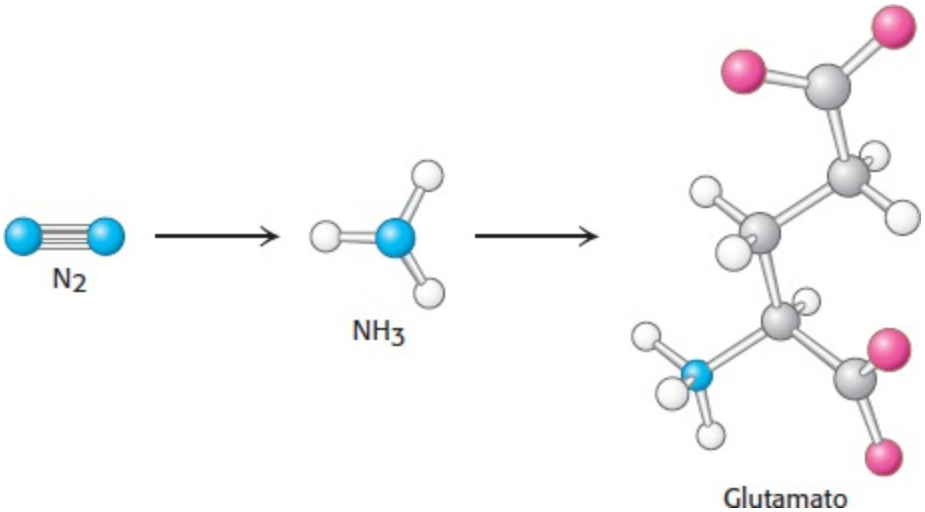
Parte 3

Síntese das Moléculas da Vida

Parte 3

Síntese das Moléculas da Vida

Biossíntese de Aminoácidos



O nitrogênio é um componente essencial dos aminoácidos. A atmosfera é rica em gás nitrogênio (N_2), uma molécula muito pouco reativa. Certos organismos, como as bactérias que vivem nos nódulos das raízes do trevo amarelo, têm a capacidade de converter o gás nitrogênio em amônia (NH_3), que pode ser então utilizada para sintetizar inicialmente o glutamato e, em seguida, outros aminoácidos. [Fotografia à esquerda, de Runk/Schoenburg/Grant Heilman Photography.]

SUMÁRIO

24.1 Fixação do nitrogênio | Os microrganismos utilizam ATP e um poderoso redutor para reduzir o nitrogênio atmosférico a amônia

24.2 Os aminoácidos são produzidos a partir de intermediários do ciclo do ácido cítrico e de outras vias importantes

24.3 A biossíntese de aminoácidos é regulada por inibição por retroalimentação

24.4 Os aminoácidos são precursores de muitas biomoléculas

A montagem das moléculas biológicas, incluindo as proteínas e os ácidos nucleicos, necessita da produção de materiais iniciadores apropriados. Já consideramos a montagem dos carboidratos na descrição do ciclo de Calvin e da via das pentoses fosfato (Capítulo 20). O presente capítulo e os dois seguintes examinarão a montagem de outros blocos de construção importantes – isto é, aminoácidos, nucleotídios e lipídios.

As vias para a biossíntese dessas moléculas são extremamente antigas, remontando ao último ancestral comum de todos os seres vivos. Com efeito, essas vias provavelmente antecedem muitas das vias de transdução de energia discutidas na Parte II e podem ter proporcionado vantagens seletivas essenciais no início da evolução. Muitos dos intermediários presentes nas vias de transdução de energia também desempenham um papel na biossíntese. Esses intermediários em comum possibilitam a interação eficiente entre as vias de transdução de energia (catabólicas) e as vias de biossíntese (anabólicas). Por conseguinte, as células são capazes de equilibrar a degradação de compostos para a mobilização de energia com a síntese de materiais iniciadores para a construção de macromoléculas.

Começaremos a nossa discussão sobre a biossíntese com os aminoácidos – os blocos de construção das proteínas e a fonte de nitrogênio para muitas outras moléculas importantes, incluindo nucleotídios, neurotransmissores e grupos prostéticos, como as porfirinas. A biossíntese de aminoácidos está intimamente ligada à nutrição, visto que muitos organismos superiores, inclusive os seres humanos, perderam a capacidade de sintetizar alguns aminoácidos e, portanto, precisam obter quantidades adequadas desses aminoácidos essenciais a partir de sua alimentação. Além disso, como algumas enzimas de biossíntese de aminoácidos estão ausentes nos mamíferos, porém presentes em vegetais e microrganismos, constituem alvos úteis para herbicidas e antibióticos.

Anabolismo

Processos de biossíntese.

Catabolismo

Processos de degradação.

Derivado do grego *ana*, "para cima"; *kata*, "para baixo"; *ballein*, "arremessar".

A síntese de aminoácidos exige soluções para três problemas bioquímicos fundamentais

O nitrogênio é um componente essencial dos aminoácidos. A Terra tem um suprimento abundante de nitrogênio, mas que se encontra principalmente na forma de gás nitrogênio atmosférico gasoso, uma molécula notavelmente inerte. Por conseguinte, um problema fundamental para os sistemas biológicos consiste em obter o nitrogênio em uma forma mais utilizável. Esse problema é resolvido por certos

microrganismos que têm a capacidade de reduzir a molécula de nitrogênio gasoso inerte N≡N em duas moléculas de amônia, em uma das reações mais fantásticas em bioquímica. O nitrogênio na forma de amônia constitui a fonte de nitrogênio para todos os aminoácidos. As estruturas de carbono provêm da via glicolítica, da via das pentoses fosfato ou do ciclo do ácido cítrico.

Na produção de aminoácidos, encontramos um problema importante na biossíntese – isto é, o controle estereoquímico. Como todos os aminoácidos, à exceção da glicina, são quirais, as vias de biossíntese precisam gerar o isômero correto com alta fidelidade. Em cada uma das 19 vias para a produção de aminoácidos quirais, a estereoquímica do átomo de carbono α é estabelecida por uma reação de transaminação, que envolve o piridoxal fosfato (PLP). Quase todas as transaminases que catalisam essas reações originam-se de um ancestral comum, ilustrando mais uma vez que as soluções efetivas para os problemas bioquímicos são conservadas no processo da evolução.

As vias de biossíntese são, com frequência, altamente reguladas, de modo que as unidades básicas de construção são sintetizadas apenas quando o seu suprimento estiver baixo. Com muita frequência, a presença de uma alta concentração do produto final de uma via inibe a atividade das enzimas que atuam no seu início. Existem frequentemente enzimas alostéricas que são capazes de perceber e responder a concentrações de substâncias químicas reguladoras. Essas enzimas assemelham-se, nas suas propriedades funcionais, à aspartato transcarbamilase e seus reguladores (Seção 10.1). Os mecanismos de retroalimentação e alostéricos asseguram que todos os 20 aminoácidos sejam mantidos em quantidades suficientes para a síntese de proteínas e outros processos.

24.1 Fixação do nitrogênio | Os microrganismos utilizam ATP e um poderoso redutor para reduzir o nitrogênio atmosférico a amônia

O nitrogênio nos aminoácidos, nas purinas, nas pirimidinas e em outras biomoléculas provém, em última análise, do nitrogênio atmosférico, N_2. O processo de biossíntese começa com a redução do N_2 a NH_3 (amônia), um processo denominado *fixação de nitrogênio.* A ligação N N extremamente forte, que tem uma energia de ligação de 940 kJ mol^{-1} (225 kcal mol^{-1}), é altamente resistente ao ataque químico. Com efeito, Antoine Lavoisier chamou o gás nitrogênio de "azoto", *da palavra grega* que significa "sem vida", em virtude de ser extremamente não reativo. Entretanto, a conversão do nitrogênio e hidrogênio para formar amônia é termodinamicamente favorável; a reação é difícil do ponto de vista cinético, visto que os intermediários na via de reação são instáveis.

Embora os organismos superiores sejam incapazes de fixar o nitrogênio, essa conversão é efetuada por algumas bactérias e Archaea. As bactérias simbióticas do gênero *Rhizobium* invadem as raízes das leguminosas e formam nódulos radiculares, nos quais fixam o nitrogênio, suprindo tanto a bactéria quanto a planta. Nunca será demais insistir na importância da fixação do nitrogênio pelos *microrganismos diazotróficos (fixadores de nitrogênio)* para o metabolismo de todos os eucariotos superiores: a quantidade de N_2 fixado por essas espécies foi estimada em 10^{11} kg por ano, ou seja, cerca de 60% do nitrogênio recém-fixado pela Terra. Os relâmpagos e a radiação ultravioleta fixam outros 15%, e os 25% restantes são fixados por processos industriais. O processo industrial de fixação de nitrogênio, conseguido por Fritz Haber, em 1910, continua sendo usado por fábricas de fertilizantes.

$$N_2 + 3\ H_2 \leftrightharpoons 2\ NH_3$$

Tipicamente, a fixação de N_2 é feita pela mistura com H_2 gasoso sobre um catalisador de ferro, a cerca de 500°C e a uma pressão de 300 atmosferas.

Para vencer o desafio cinético, o processo biológico de fixação de nitrogênio necessita de uma enzima complexa com múltiplos centros redox. O *complexo de nitrogenase*, responsável por essa transformação fundamental, consiste em duas proteínas: uma *redutase*, que fornece elétrons com alto poder redutor, e uma *nitrogenase*, que utiliza esses elétrons para reduzir o N_2 a NH_3. A transferência de elétrons do componente redutase para a nitrogenase está acoplada com a hidrólise do ATP pela redutase (Figura 24.1). O complexo de nitrogenase é particularmente sensível à inativação pelo O_2. As leguminosas mantêm uma concentração muito baixa de O_2 livre em seus nódulos radiculares ao ligar o O_2 à *leg-hemoglobina*, um homólogo da hemoglobina.

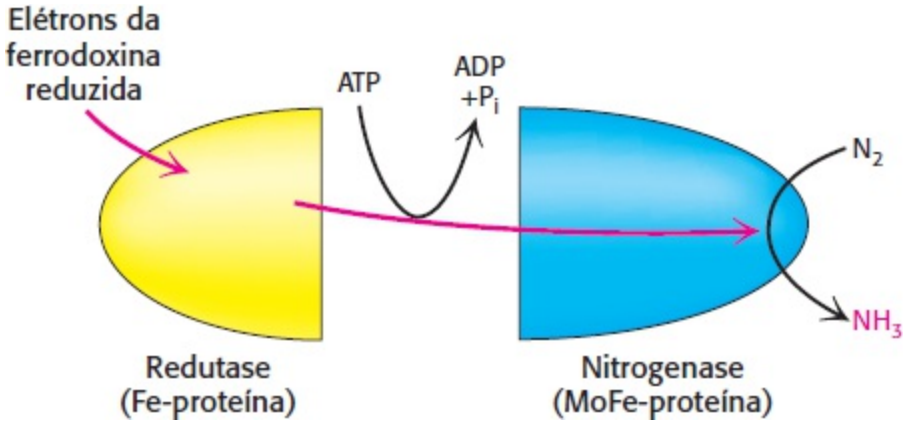


Figura 24.1 Fixação do nitrogênio. Os elétrons fluem da ferredoxina para a redutase (ferro-proteína ou Fe-proteína) e, daí, para a nitrogenase (proteína de molibdênio-ferro ou MoFe-proteína) para reduzir o nitrogênio a amônia. A hidrólise do ATP dentro da redutase impulsiona as mudanças conformacionais necessárias para a transferência eficiente de elétrons.

Em princípio, a redução do N_2 aNH_3 é um processo de seis elétrons.

$$N_2 + 6\ e^- + 6\ H^+ \rightarrow 2\ NH_3$$

Todavia, a reação biológica sempre produz pelo menos 1 mol de H_2, além de 2 moles de NH_3 para cada mol de N≡N. Por conseguinte, é necessária a entrada de dois elétrons adicionais.

$$N_2 + 8\ e^- + 8\ H^+ \rightarrow 2\ NH_3 + H_2$$

Na maioria dos microrganismos fixadores de nitrogênio, *os oito elétrons de alto potencial provêm da ferredoxina reduzida*, gerada pela fotossíntese ou por processos oxidativos. Duas moléculas de ATP são hidrolisadas para cada elétron transferido. Por conseguinte, *pelo menos 16 moléculas de ATP são hidrolisadas para cada molécula de N_2 reduzida.*

$$N_2 + 8\ e^- + 8\ H^+ + 16\ ATP + 16\ H_2O \rightarrow$$
$$2\ NH_3 + H_2 + 16\ ADP + 16\ P_i$$

Mais uma vez, não há necessidade de hidrólise do ATP para que a redução do nitrogênio seja termodinamicamente favorável. Na verdade, ela é essencial para reduzir as altas barreiras de ativação ao longo da via de reação, tornando, assim, a reação cineticamente exequível.

O cofator ferro-molibdênio da nitrogenase liga-se ao nitrogênio atmosférico e o reduz

Ambos os componentes de redutase e nitrogenase do complexo são *proteínas de ferro-enxofre*, em que o ferro está ligado ao átomo de enxofre de um resíduo de cisteína e ao sulfeto inorgânico. Convém lembrar que os grupamentos de ferro-enxofre atuam como carreadores de elétrons (Seção 18.3). A *redutase* (também denominada *ferro-proteína* ou *Fe-proteína*) é um dímero com subunidades idênticas de 30 kDa por um grupamento de 4Fe-4S (Figura 24.2).

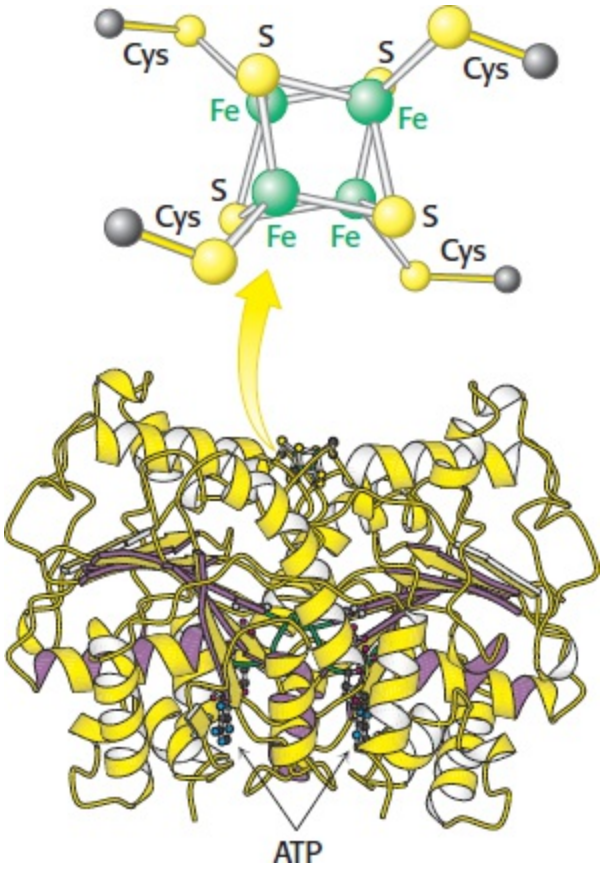


Figura 24.2 Fe-proteína. Esta proteína é um dímero composto de duas cadeias polipeptídicas ligadas por um grupamento de 4Fe-4S. *Observe* que cada monômero é um membro da família da NTPase com alça P e contém um sítio de ligação de ATP. [Desenhada a partir de 1N2C.pdb.]

O papel da redutase consiste em transferir elétrons de um doador apropriado, como a ferredoxina reduzida, ao componente de nitrogenase. O grupamento de 4Fe-4S transporta os elétrons, um de cada vez, para a nitrogenase. A ligação e a hidrólise do ATP desencadeiam uma mudança conformacional que desloca a redutase para um local mais próximo do componente de nitrogenase, onde é capaz de transferir o seu elétron para o centro de redução do nitrogênio. A estrutura da região de ligação do ATP revela ser um membro da família de NTPase com alça P (Seção 9.4), que está claramente relacionada com as regiões de ligação de nucleotídios encontradas nas proteínas G e em proteínas relacionadas. Assim, temos outro exemplo de como esse domínio tem sido recrutado na evolução em virtude de sua capacidade de acoplar a hidrólise de nucleosídio trifosfato com mudanças conformacionais.

O componente de nitrogenase é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ (240 kDa), em que as subunidades α e β são homólogas uma à outra e muito semelhantes do ponto de vista estrutural (Figura 24.3). Devido à presença de molibdênio nesse aglomerado, o componente de nitrogenase é também denominado *molibdênio-ferro-proteína* (MoFe-proteína). O cofator FeMo consiste em dois aglomerados de M-3Fe-3S, nos quais o molibdênio ocupa o sítio M em um aglomerado, enquanto o ferro ocupa o outro.

Os dois aglomerados são unidos por três íons sulfeto e um átomo central, cuja identidade ainda não foi definitivamente estabelecida. O cofator FeMo está também coordenado a um componente de homocitrato e à subunidade α por meio de um resíduo de histidina e um resíduo de cisteinato. Esse cofator é distinto, aparentemente, de todas as outras enzimas que contêm molibdênio.

Os elétrons da redutase entram nos *aglomerados P*, que estão localizados na interface α–β. O papel dos aglomerados P consiste em armazenar elétrons até que possam ser utilizados de modo produtivo para reduzir o nitrogênio no cofator FeMo. *O cofator FeMo constitui o local de fixação do nitrogênio.* Uma face do cofator FeMo constitui, provavelmente, o local de redução do nitrogênio. As reações de transferência de elétrons a partir do aglomerado P ocorrem em combinação com a ligação de íons hidrogênio ao nitrogênio quando este é reduzido. Outros estudos estão em andamento para elucidar o mecanismo dessa notável reação.

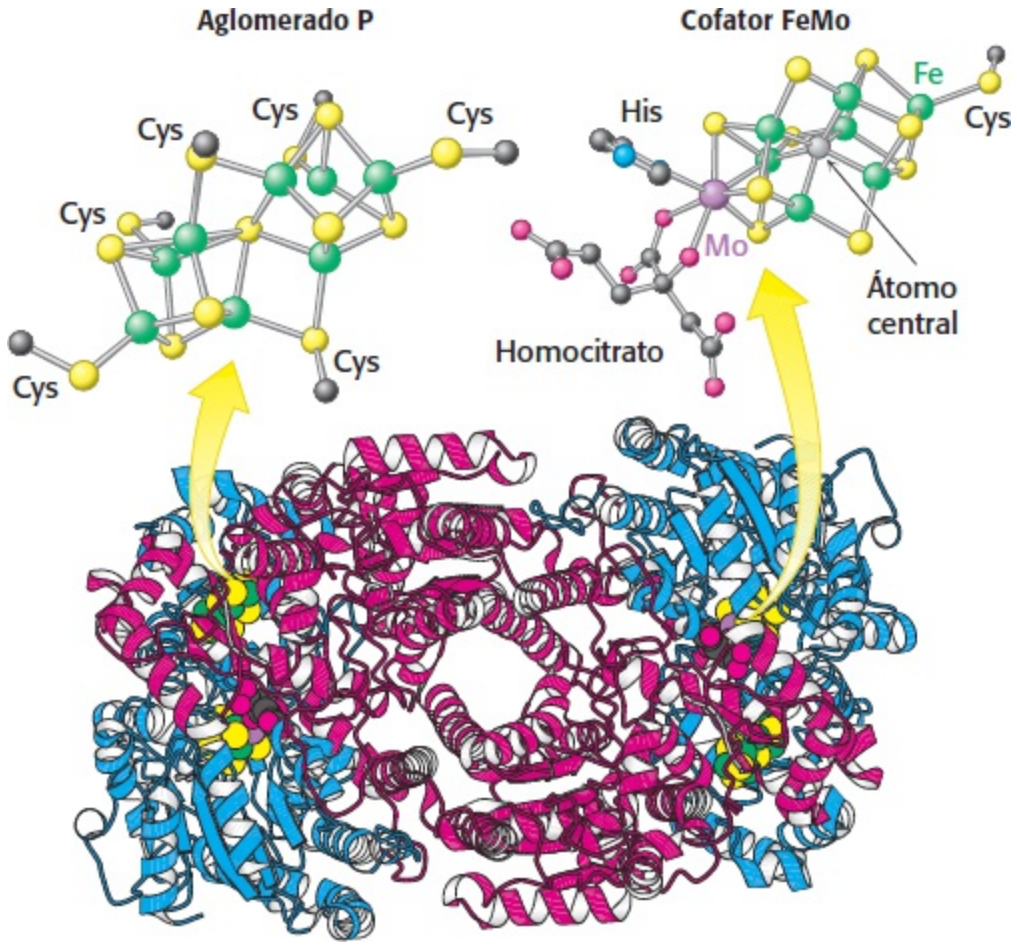


Figura 24.3 MoFe-proteína. Esta proteína é um heterotetrâmero composto de duas subunidades α (em vermelho) e duas subunidades β (em azul). *Observe* que a proteína contém duas cópias de cada um de dois tipos de aglomerados: aglomerados P e cofatores FeMo. Cada aglomerado P contém oito átomos de ferro (em verde) e sete sulfetos ligados à proteína por seis resíduos de cisteinato. Cada cofator FeMo contém um átomo de molibdênio, sete átomos de ferro, nove sulfetos, um átomo central e um homocitrato e está ligado à proteína por um resíduo de cisteinato e um resíduo de histidina. [Desenhada a partir de 1M1N.pdb.]

O íon amônio é assimilado em um aminoácido por meio do glutamato e da glutamina

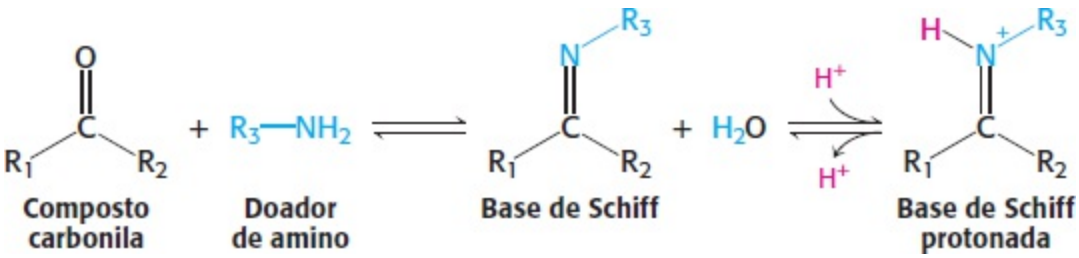
A etapa seguinte na assimilação do nitrogênio em biomoléculas consiste na entrada de NH_4^+ em aminoácidos. Os aminoácidos *glutamato* e *glutamina* desempenham papéis centrais nesse aspecto, atuando como doadores de nitrogênio para a maioria dos aminoácidos. O grupo α-amino da maioria dos aminoácidos provém do grupo α-amino do glutamato por transaminação (Seção 23.3). A

glutamina, o outro doador principal de nitrogênio, contribui com o átomo de nitrogênio de sua cadeia lateral para a biossíntese de uma ampla variedade de compostos importantes, incluindo os aminoácidos triptofano e histidina.

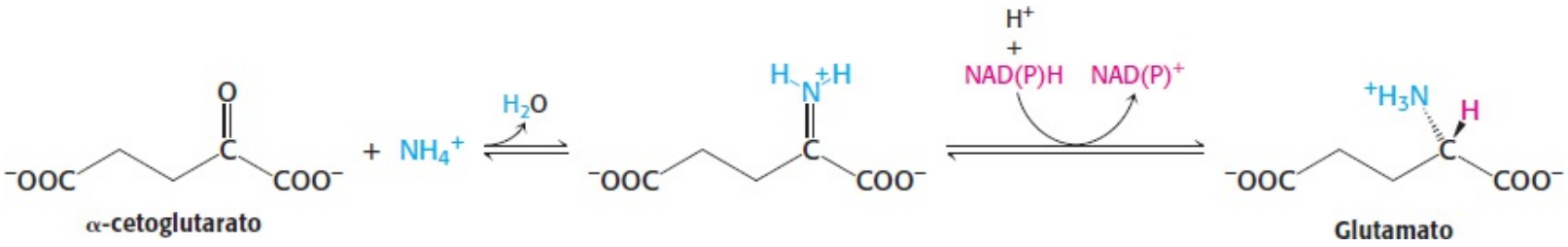
O glutamato é sintetizado a partir NH_4^+ e α-cetoglutarato, um intermediário do ciclo do ácido cítrico, pela ação da *glutamato desidrogenase*. Já encontramos essa enzima na degradação de aminoácidos (Seção 23.3). É importante lembrar que o NAD^+ é o oxidante no catabolismo, enquanto o NADPH é o redutor nos processos de biossíntese. A glutamato desidrogenase é incomum, visto que ela não discrimina entre o NADH e o NADPH, pelo menos em algumas espécies.

$$NH_4^+ + \text{α-cetoglutarato} + NADPH + H^+ \leftrightharpoons \text{glutamato} + NADP^+ + H_2O$$

A reação ocorre em duas etapas. Na primeira, forma-se uma base de Schiff entre a amônia e o α-cetoglutarato. A formação de uma base de Schiff entre uma amina e um composto carbonila constitui uma reação essencial que ocorre em muitos estágios de biossíntese e degradação de aminoácidos.



As bases de Schiff são facilmente protonadas. Na segunda etapa, a base de Schiff protonada é reduzida pela transferência de um íon hidreto do NADPH para formar glutamato.



Essa reação é crucial, visto que ela estabelece a estereoquímica do átomo de carbono α (configuração absoluta *S*) no glutamato. A enzima liga-se ao substrato de α-cetoglutarato, de tal modo que o hidreto transferido do NAD(P)H é acrescentado para formar o isômero L do glutamato (Figura 24.4). Como veremos adiante, essa estereoquímica é estabelecida para outros aminoácidos por reações de transaminação que dependem do piridoxal fosfato.

Um segundo íon amônio é incorporado no glutamato para formar glutamina pela ação da *glutamina sintetase*. Essa amidação é impulsionada pela hidrólise do ATP. O ATP participa diretamente na reação ao fosforilar a cadeia lateral do glutamato, formando um intermediário acil-fosfato que, em seguida, reage com amônia, produzindo glutamina.

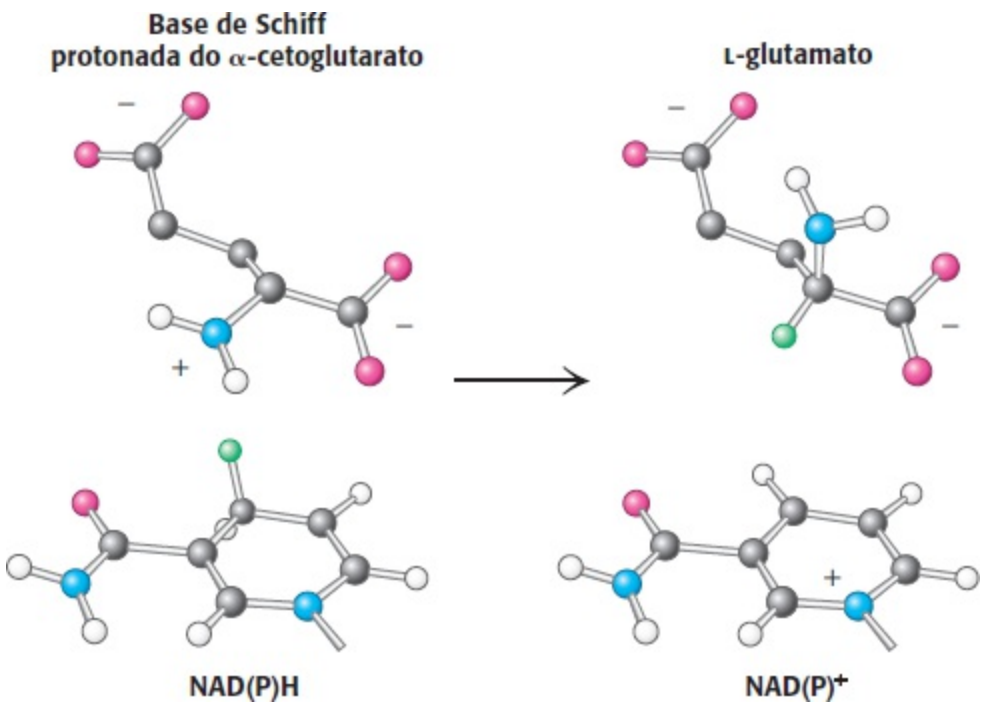
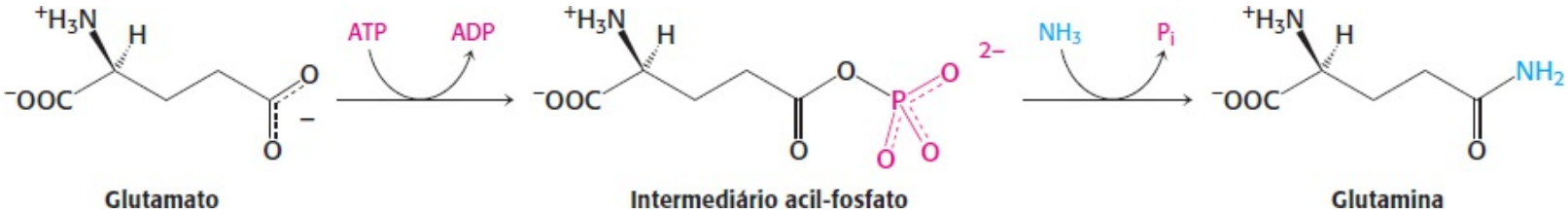


Figura 24.4 Estabelecimento da quiralidade. No sítio ativo da glutamato desidrogenase, a transferência de hidreto (verde) do NAD(P)H para uma face específica da base de Schiff protonada não quiral do α-cetoglutarato estabelece a configuração L do glutamato.



Forma-se um sítio de ligação de amônia de alta afinidade na enzima somente após a produção do intermediário acil-fosfato. É necessário um sítio específico para a ligação da amônia para impedir o ataque pela água, hidrolisando o intermediário e desperdiçando uma molécula de ATP. A regulação da glutamina sintetase desempenha um papel essencial no controle do metabolismo do nitrogênio (Seção 24.3).

A glutamato desidrogenase e a glutamina sintetase são encontradas em todos os organismos. A maioria dos procariotos também contém *glutamato sintase*, uma enzima não relacionada em termos evolutivos, que catalisa a aminação redutora do α-cetoglutarato em glutamato. A glutamina é o doador de nitrogênio.

$$\alpha\text{-cetoglutarato} + \text{glutamina} + \text{NADPH} + H^+ \rightleftharpoons 2\ \text{glutamato} + \text{NADP}^+$$

A amida da cadeia lateral da glutamina é hidrolisada para gerar amônia dentro da enzima, um tema recorrente em todo o metabolismo do nitrogênio. *Quando o NH_4^+ é limitante, a maior parte do glutamato formado ocorre pela ação sequencial da glutamina sintetase e da glutamato sintase.* A soma dessas reações é

$$NH_4^+ + \alpha\text{-cetoglutarato} + \text{NADPH} + \text{ATP} \rightarrow$$
$$\text{glutamato} + \text{NADP}^+ + \text{ADP} + P_i$$

Observe que essa estequiometria difere daquela da reação da glutamato desidrogenase, visto que

ocorre hidrólise do ATP. Por que os procariotos utilizam algumas vezes essa via mais dispendiosa? A resposta é que o valor de K_M da glutamato desidrogenase para o NH_4^+ é elevado (cerca de 1 mM), de modo que essa enzima não está saturada quando o NH_4^+ é limitante. Em contrapartida, a glutamina sintetase exibe uma afinidade muito alta pelo NH_4^+. Por conseguinte, a hidrólise do ATP é necessária para capturar a amônia quando esta está escassa.

24.2 Os aminoácidos são produzidos a partir de intermediários do ciclo do ácido cítrico e de outras vias importantes

Até aqui consideramos a conversão do N_2 em NH_4^+ e a assimilação do NH_4^+ no glutamato e na glutamina. Agora analisaremos a biossíntese dos outros aminoácidos, cuja maioria obtém o seu nitrogênio a partir do glutamato ou da glutamina. As vias de biossíntese dos aminoácidos são diversas. Todavia, elas têm uma importante característica em comum: *seus esqueletos de carbono provêm de intermediários da glicólise, da via das pentoses fosfato ou do ciclo do ácido cítrico.* Com base nesses materiais iniciadores, os aminoácidos podem ser classificados em seis famílias de biossíntese (Figura 24.5).

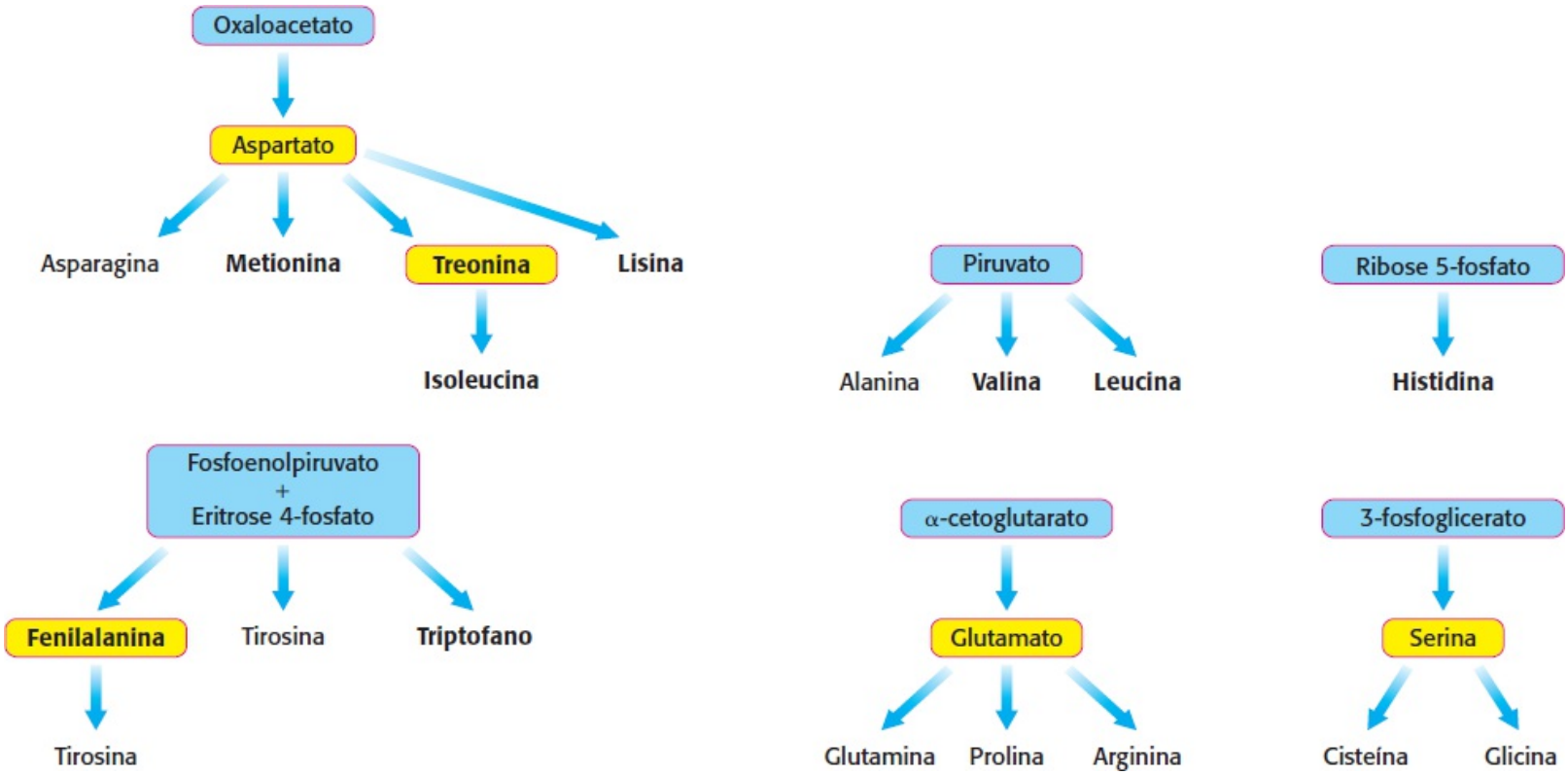


Figura 24.5 Famílias de biossíntese dos aminoácidos em bactérias e plantas. Os principais precursores metabólicos estão realçados em azul. Os aminoácidos que dão origem a outros aminoácidos estão realçados em amarelo. Os aminoácidos essenciais estão em negrito.

Os seres humanos podem sintetizar alguns aminoácidos, porém precisam obter outros da alimentação

A maioria dos microrganismos, como *E. coli*, tem a capacidade de sintetizar todo o conjunto básico de 20 aminoácidos, enquanto os seres humanos são incapazes de sintetizar 9 deles. Os aminoácidos que precisam ser fornecidos na alimentação são denominados *aminoácidos essenciais*, enquanto os

outros são designados como *aminoácidos não essenciais* (Tabela 24.1). Essas designações referem-se às necessidades de um organismo em um determinado conjunto de condições. Por exemplo, a arginina é sintetizada em quantidades suficientes pelo ciclo da ureia para atender às necessidades de um adulto, mas talvez não àquelas de uma criança em crescimento. A deficiência de até mesmo um aminoácido resulta em *balanço nitrogenado negativo.* Nesse estado, a degradação de proteínas é maior do que a sua síntese, de modo que mais nitrogênio é excretado do que ingerido.

Tabela 24.1 Conjunto básico de 20 aminoácidos.

Não essenciais	Essenciais
Alanina	Histidina
Arginina	Isoleucina
Arparagina	Leucina
Aspartato	Lisina
Cisteína	Metionina
Glutamato	Fenilalanina
Glutamina	Treonina
Glicina	Triptofano
Prolina	Valina
Serina	
Tirosina	

Os aminoácidos não essenciais são sintetizados por reações bastante simples, enquanto as vias para a formação dos aminoácidos essenciais são muito complexas. Por exemplo, os aminoácidos não essenciais *alanina* e *aspartato* são sintetizados em uma única etapa a partir do piruvato e do oxaloacetato, respectivamente. Em contrapartida, as vias para os aminoácidos essenciais exigem 5 a 16 etapas (Figura 24.6). A única exceção a esse padrão é a arginina, visto que a síntese *de novo* desse aminoácido não essencial exige 10 etapas. Tipicamente, entretanto, a sua síntese ocorre em apenas três etapas a partir da ornitina como parte do ciclo da ureia. A tirosina, que é classificada como aminoácido não essencial, já que pode ser sintetizada em uma etapa a partir da fenilalanina, necessita de 10 etapas para ser sintetizada desde o início e é essencial se a fenilalanina não estiver presente em quantidades abundantes. Iniciaremos com a biossíntese dos aminoácidos não essenciais.

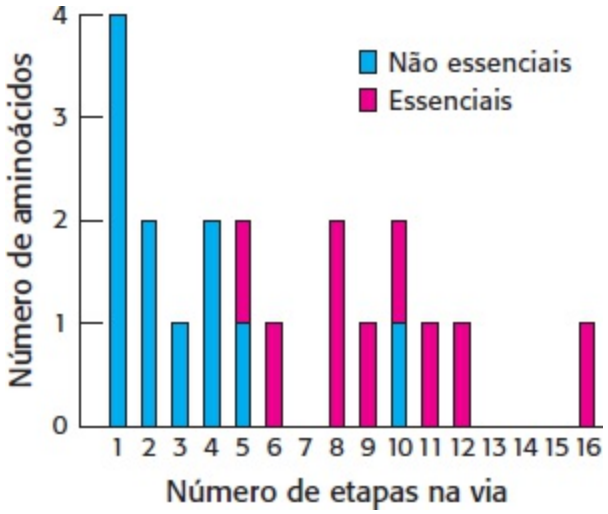


Figura 24.6 Aminoácidos essenciais e não essenciais. Alguns aminoácidos não são essenciais para os seres humanos, pois eles podem ser biossintetizados em um pequeno número de etapas. Os aminoácidos que necessitam de um grande número de etapas para a sua síntese são essenciais na alimentação, já que algumas das enzimas para essas etapas foram perdidas durante a evolução.

O aspartato, a alanina e o glutamato são sintetizados pela adição de um grupo amino a um alfacetoácido

Três α-cetoácidos – o α-cetogluratato, o oxaloacetato e o piruvato – podem ser convertidos em aminoácidos em uma única etapa pela adição de um grupo amino. Já tivemos a oportunidade de ver que o α-cetoglutarato pode ser convertido em glutamato por aminação redutora (p. 715). O grupo amino do glutamato pode ser transferido para outros α-cetoácidos por reações de transaminação. Por conseguinte, o aspartato e a alanina podem ser produzidos pela adição de um grupo amino ao oxaloacetato e ao piruvato, respectivamente.

$$\text{Oxaloacetato} + \text{glutamato} \leftrightharpoons \text{aspartato} + \alpha\text{-cetoglutarato}$$

$$\text{Piruvato} + \text{glutamato} \leftrightharpoons \text{alanina} + \alpha\text{-cetoglutarato}$$

Essas reações são efetuadas por *transaminases dependentes de piridoxal fosfato.* As reações de transaminação são necessárias para a síntese da maioria dos aminoácidos.

Na Seção 23.3, analisamos o mecanismo das transaminases quando aplicado ao metabolismo dos aminoácidos. Faremos uma revisão do mecanismo das transaminases quando ele opera na *biossíntese* de aminoácidos (ver Figura 23.11). A via da reação começa com o *piridoxal fosfato* em uma ligação de base de Schiff com uma lisina no sítio ativo da transaminase, formando uma aldimina interna (Figura 24.7). Um grupo amino é transferido do glutamato para formar piridoxamina fosfato (PMP), o verdadeiro doador de amino, em um processo de múltiplas etapas. Em seguida, a PMP reage com um α-cetoácido entrante, formando uma cetimina. A perda de prótons dá origem a um intermediário quinonoide, que, em seguida, aceita um próton em um local diferente para formar uma aldimina externa. O aminoácido recém-formado é liberado com a formação concomitante da aldimina interna.

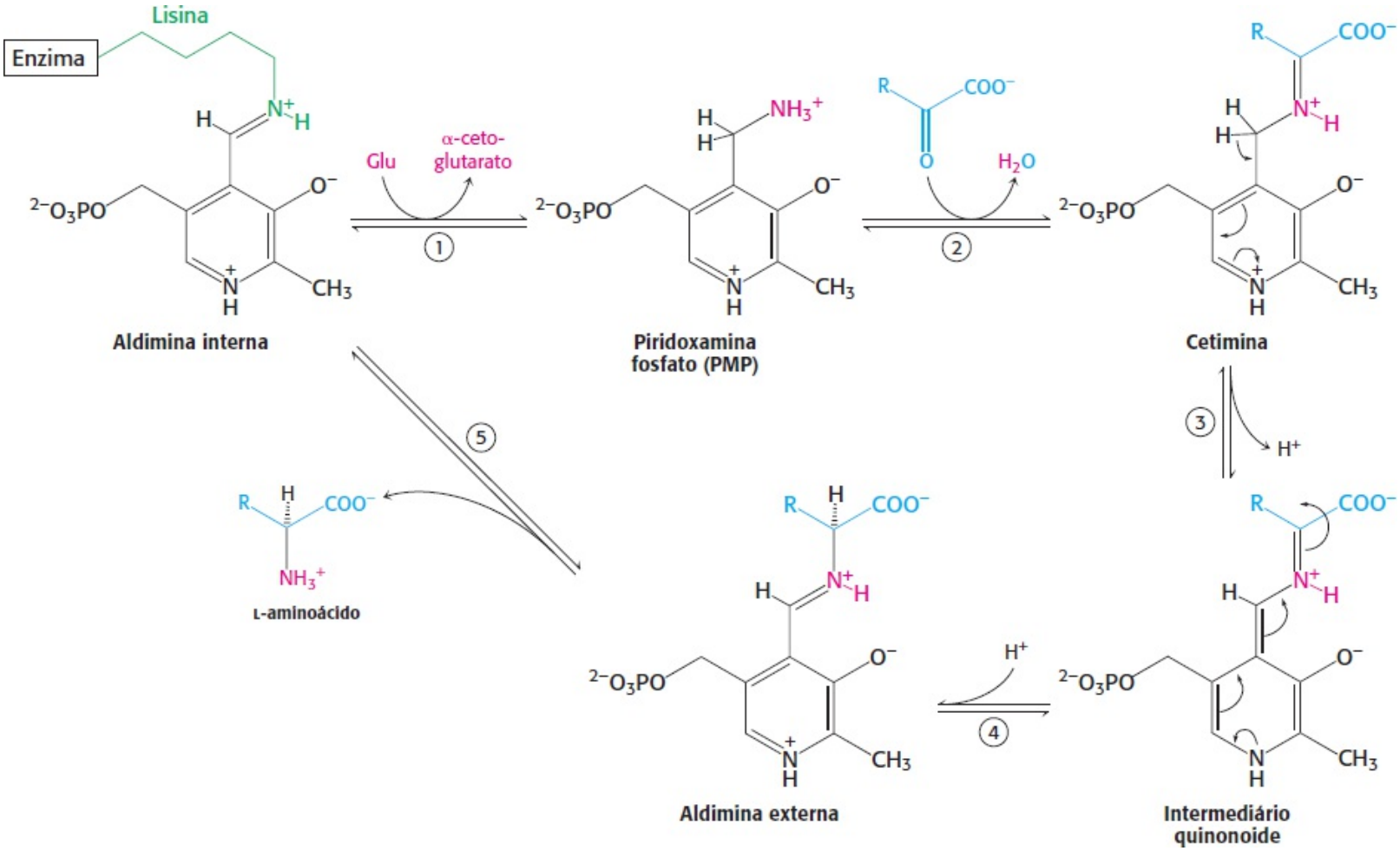


Figura 24.7 Biossíntese de aminoácidos por transaminação. **1**. Dentro de uma transaminase, a aldimina interna é convertida em piridoxamina fosfato (PMP) pela reação com glutamato, em um processo de múltiplas etapas não ilustradas. **2.** Em seguida, a PMP reage com um α-cetoácido, produzindo uma cetimina. **3.** Esse intermediário é convertido em um intermediário quinonoide **(4)** que, por sua vez, produz uma aldimina externa. **5.** A aldimina é clivada para liberar o aminoácido recém-formado, completando o ciclo.

Uma etapa comum determina a quiralidade de todos os aminoácidos

A aspartato aminotransferase é o protótipo de uma grande família de enzimas dependentes de PLP. Comparações das sequências de aminoácidos, bem como de várias estruturas tridimensionais, revelam que quase todas as transaminases que desempenham um papel na biossíntese de aminoácidos estão relacionadas com a aspartato aminotransferase por evolução divergente. Um exame das sequências de aminoácidos alinhadas revela que dois resíduos são totalmente conservados. São eles: o resíduo de lisina, que forma a base de Schiff com o cofator PLP (lisina 258 na aspartato aminotransferase), e um resíduo de arginina, que interage com o grupo α-carboxilato do cetoácido (ver Figura 23.12).

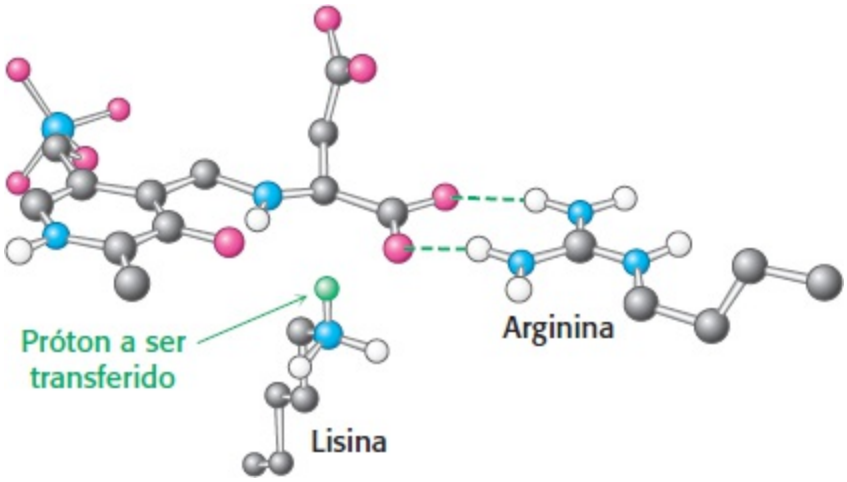


Figura 24.8 Estereoquímica da adição de próton. Em um sítio ativo da transaminase, a adição de um próton do resíduo de lisina à face inferior do intermediário quinonoide determina a configuração L do aminoácido produzido. O resíduo de arginina conservado interage com o grupo α-carboxilato e ajuda a estabelecer a geometria apropriada do intermediário quinonoide.

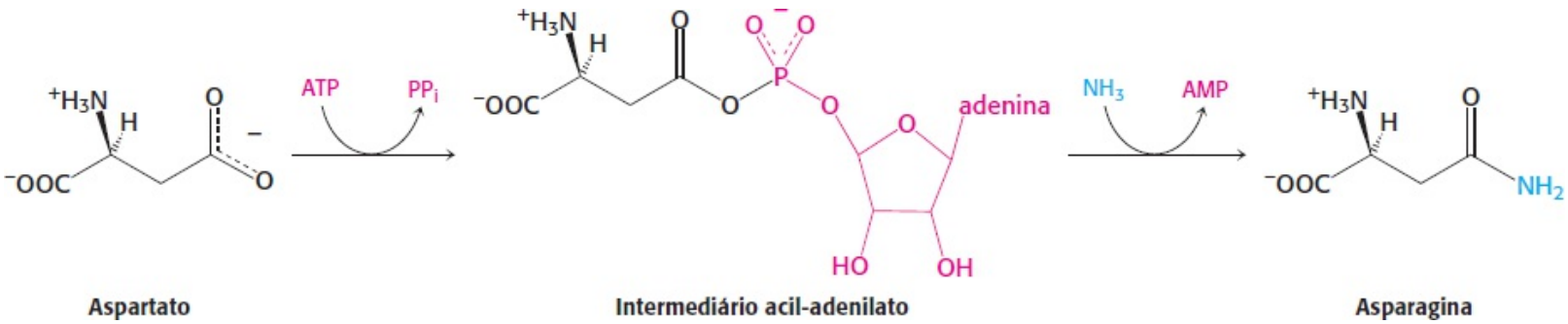
Uma etapa essencial na reação de transaminação é a protonação do intermediário quinonoide para formar a aldimina externa. *A quiralidade do aminoácido formado é determinada pelo sentido a partir do qual esse próton é acrescentado à forma quinonoide* (Figura 24.8). A interação entre o resíduo de arginina conservado e o grupo α-carboxilato ajuda a orientar o substrato, de modo que o resíduo de lisina transfere um próton para a face inferior do intermediário quinonoide, produzindo uma aldimina com configuração L no centro do C_α.

A formação de asparagina a partir do aspartato exige um intermediário adenilado

A formação de asparagina a partir do aspartato é quimicamente análoga à formação da glutamina a partir do glutamato. Ambas as transformações são reações de amidação, e ambas são impulsionadas pela hidrólise do ATP. Todavia, as reações são diferentes. Nas bactérias, a reação para a síntese da asparagina é a seguinte:

$$\text{Aspartato} + NH_4^+ + \text{ATP} \rightarrow \text{asparagina} + \text{AMP} + PP_i + H^+$$

Por conseguinte, os produtos da hidrólise do ATP são o AMP e PP_i, e não ADP e P_i. O aspartato é ativado por adenilação, e não por fosforilação.



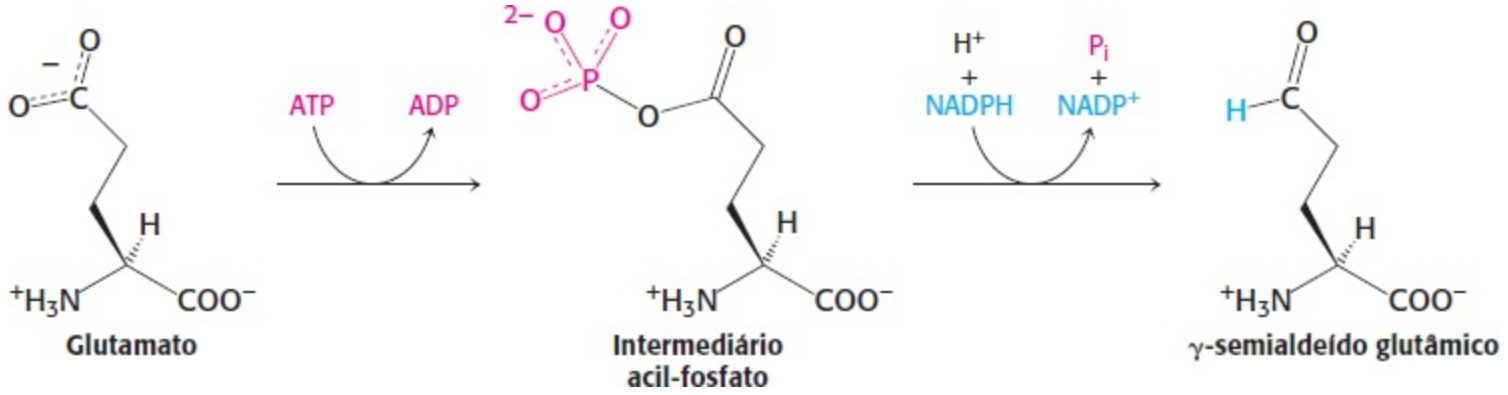
Já encontramos esse modo de ativação na degradação de ácidos graxos e o veremos novamente na síntese de lipídios e proteínas.

Nos mamíferos, o doador de nitrogênio para a asparagina é a glutamina, e não a amônia, como nas bactérias. A amônia é gerada pela hidrólise da cadeia lateral da glutamina e transferida diretamente

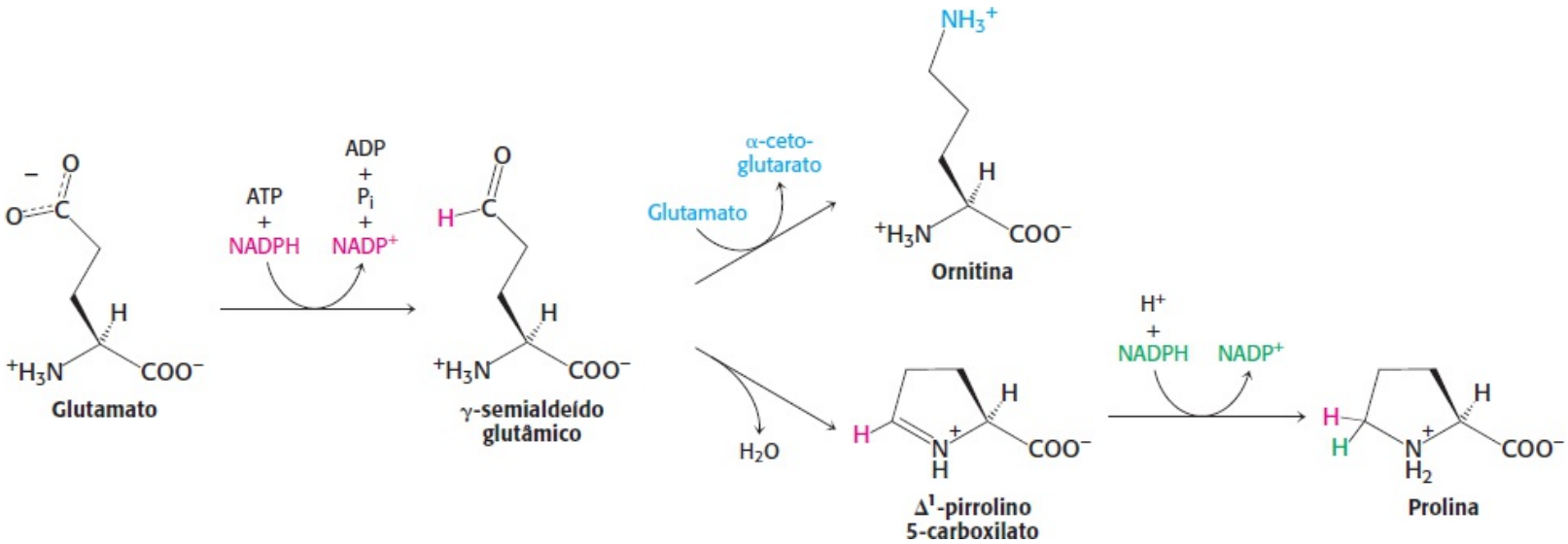
ao aspartato ativado, ligado no sítio ativo. Uma vantagem é que a célula não sofre exposição direta ao NH_4^+, que, em níveis elevados, é tóxico para os seres humanos e outros mamíferos. *A utilização da hidrólise da glutamina como mecanismo de produção de amônia para uso dentro da mesma enzima constitui um tema comum em todas as vias de biossíntese.*

O glutamato é o precursor da glutamina, da prolina e da arginina

A síntese de glutamato pela aminação redutora do α-cetoglurato já foi discutida, assim como a conversão do glutamato em glutamina (p. 716). O glutamato é o precursor de outros dois aminoácidos não essenciais: a *prolina* e a *arginina.* Em primeiro lugar, o grupo γ-carboxila do glutamato reage com ATP, formando um acil-fosfato. Esse anidrido misto é então reduzido pelo NADPH a um aldeído.

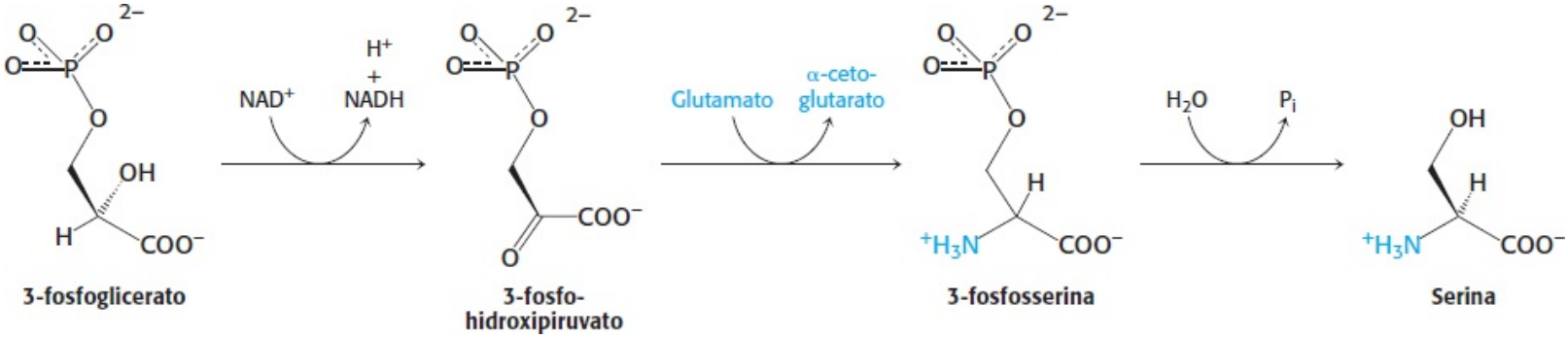


O γ-semialdeído glutâmico cicliza com a perda de H_2O em um processo não enzimático, dando origem ao Δ^1-pirrolino 5-carboxilato, que é reduzido pelo NADPH a prolina. De modo alternativo, o semialdeído pode ser transaminado a ornitina, que é convertida, em várias etapas, em arginina (ver Figura 23.17).



O 3-fosfoglicerato é o precursor da serina, da cisteína e da glicina

A serina é sintetizada a partir do 3-fosfoglicerato, um intermediário da glicólise. A primeira etapa consiste em oxidação a 3-fosfo-hidroxipiruvato. Esse α-cetoácido é transaminado a 3-fosfosserina, que é então hidrolisada a serina.



A serina é o precursor da *cisteína* e da *glicina*. Como veremos adiante, a conversão da serina em cisteína exige a substituição de um átomo de enxofre derivado da metionina para o átomo de oxigênio da cadeia lateral. Na formação da glicina, o grupo metileno da cadeia lateral da serina é transferido ao *tetra-hidrofolato*, um carreador de unidades de um carbono sobre o qual discutiremos brevemente.

Serina + tetra-hidrofolato →

glicina + N^5,N^{10}-metileno-tetra-hidrofolato + H_2O

Essa interconversão é catalisada pela *serina hidroximetil transferase*, uma enzima PLP que é homóloga à aspartato aminotransferase. A formação da base de Schiff da serina torna a ligação entre os átomos de carbono α e β suscetível à clivagem, possibilitando a transferência do carbono β para o tetra-hidrofolato e produzindo a base de Schiff de glicina.

O tetra-hidrofolato atua como carreador de unidades de um carbono ativadas em vários níveis de oxidação

O *tetra-hidrofolato* (também denominado *tetra-hidropteroilglutamato*) é um carreador altamente versátil de unidades de um carbono ativadas. Esse cofator consiste em três grupos: uma pteridina substituída, o *p*-aminobenzoato e uma cadeia de um ou mais resíduos de glutamato (Figura 24.9). Os mamíferos podem sintetizar o anel de pteridina, porém são incapazes de conjugálo às outras duas unidades. Eles obtêm o tetra-hidrofolato a partir de sua alimentação ou de microrganismos presentes no trato intestinal.

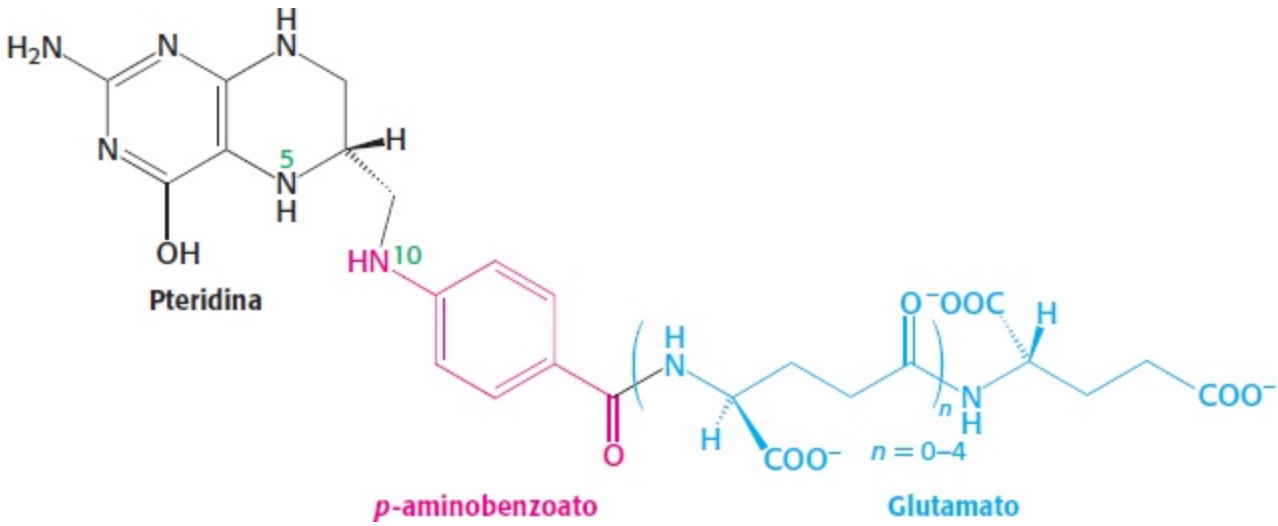


Figura 24.9 Tetra-hidrofolato. Esse cofator inclui três componentes: um anel de pteridina, o *p*-aminobenzoato e um ou mais resíduos de glutamato.

O grupo de um carbono transportado pelo tetra-hidrofolato liga-se a seu átomo de nitrogênio N-5 ou N-10 (indicados como N^5 e N^{10}), ou a ambos. Essa unidade pode existir em três estados de oxidação (Tabela 24.2). A forma mais reduzida transporta um grupo *metila*, enquanto a forma intermediária transporta um grupo *metileno*. Formas mais oxidadas transportam um grupo formil, formímino ou *metenil*. A unidade de um carbono totalmente oxidada, CO_2, é transportada mais pela biotina do que pelo tetra-hidrofolato.

As unidades de um carbono transportadas pelo tetra-hidrofolato são interconversíveis (Figura 24.10). O N^5,N^{10}-*metileno*-tetra-hidrofolato pode ser reduzido a N^5-*metil*-tetra-hidrofolato, ou oxidado a N^5,N^{10}-*metenil*-tetra-hidrofolato. O N^5,N^{10}-*metenil*-tetra-hidrofolato pode ser convertido em N^5-formimino-tetra-hidrofolato ou N^{10}-*formil*-tetra-hidrofolato, ambos os quais estão no mesmo nível de oxidação. O N^{10}-*formil*-tetrahidrofolato também pode ser sintetizado a partir do tetra-hidrofolato, formato e ATP.

Formato + ATP + tetra-hidrofolato →

N^{10}-formil-tetra-hidrofolato + ADP + P_i

O N^5-*formil*-tetra-hidrofolato pode ser isomerizado de modo reversível a N^{10}-*formil*-tetra-hidrofolato, ou pode ser convertido em N^5,N^{10}-*metenil*tetra-hidrofolato.

Tabela 24.2 Grupos de um carbono transportados pelo tetra-hidrofolato.

	Grupo	
Estado de oxidação	Fórmula	Nome
Mais reduzido (= metanol)	$-CH_3$	Metila
Intermediário (= formaldeído)	$-CH_2-$	Metileno
Mais oxidado (= ácido fórmico)	–CHO	Formil
	–CHNH	Formimino
	–CH=	Metenil

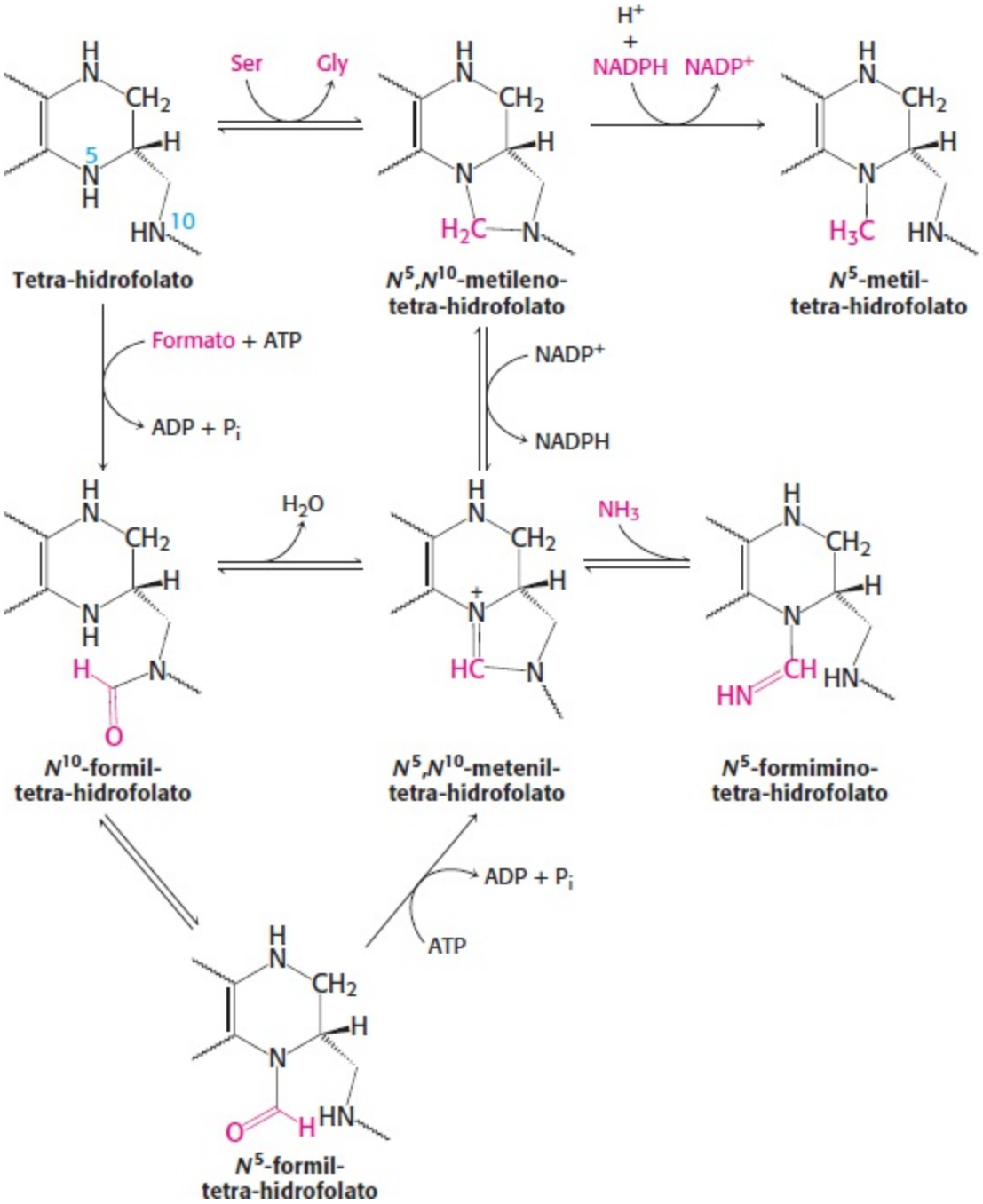


Figura 24.10 Conversões de unidades de um carbono fixadas ao tetra-hidrofolato.

Esses derivados do tetra-hidrofolato atuam como doadores de unidades de um carbono em uma variedade de processos de biossíntese. A *metionina* é regenerada a partir da homocisteína pela transferência do grupo metil do N^5-metil-tetra-hidrofolato, como ainda discutiremos. No Capítulo 25, veremos que alguns dos átomos de carbono das *purinas* são adquiridos de derivados do N^{10}-formil-tetra-hidrofolato. O grupo metil da *timina*, uma pirimidina, provém do N^5, N^{10}-metileno-tetra-hidrofolato. Esse derivado do tetra-hidrofolato também pode doar uma unidade de um carbono em uma síntese alternativa da *glicina*, que começa com CO_2 e NH_4^+, uma reação catalisada pela *glicina sintase* (denominada *enzima de clivagem da glicina* quando opera no sentido inverso).

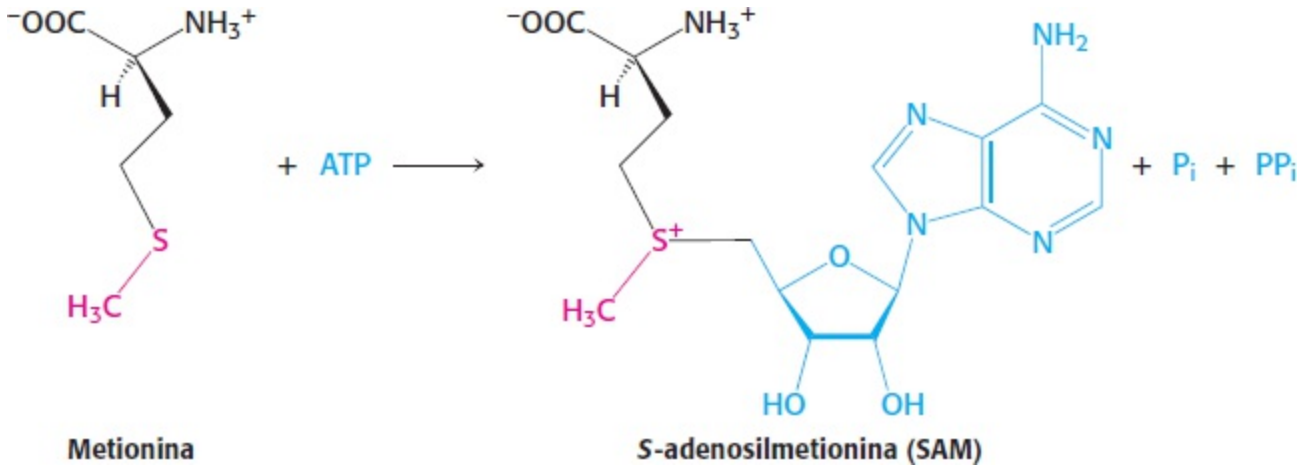
$$CO_2 + NH_4^+ + N^5,N^{10}\text{-metileno-tetra-hidrofolato} + NADH \leftrightharpoons$$
$$\text{glicina} + \text{tetra-hidrofolato} + NAD^+$$

Por conseguinte, as unidades de um carbono em cada um dos três níveis de oxidação são utilizadas

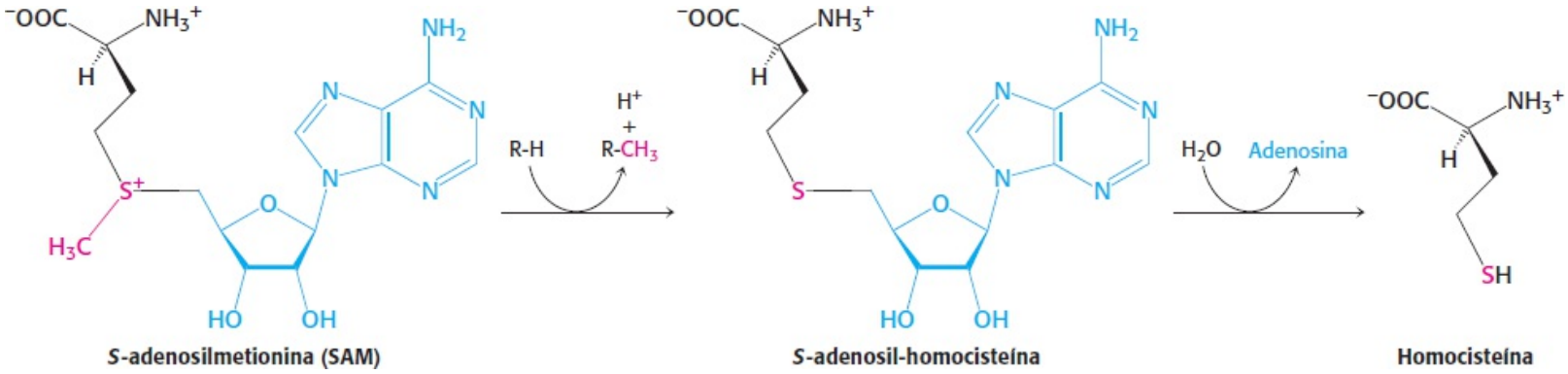
em processos de biossíntese. Além disso, *o tetra-hidrofolato atua como aceptor de unidades de um carbono em reações de degradação.* A principal fonte de unidades de um carbono consiste na conversão fácil da serina em glicina pela serina hidroximetil transferase (p. 721), que produz N^5,N^{10}-metileno-tetra-hidrofolato. A serina pode originar-se do 3-fosfoglicerato, e, portanto, *essa via possibilita a formação* de novo *de unidades de um carbono a partir de carboidratos.*

A *S*-adenosilmetionina é o principal doador de grupos metila

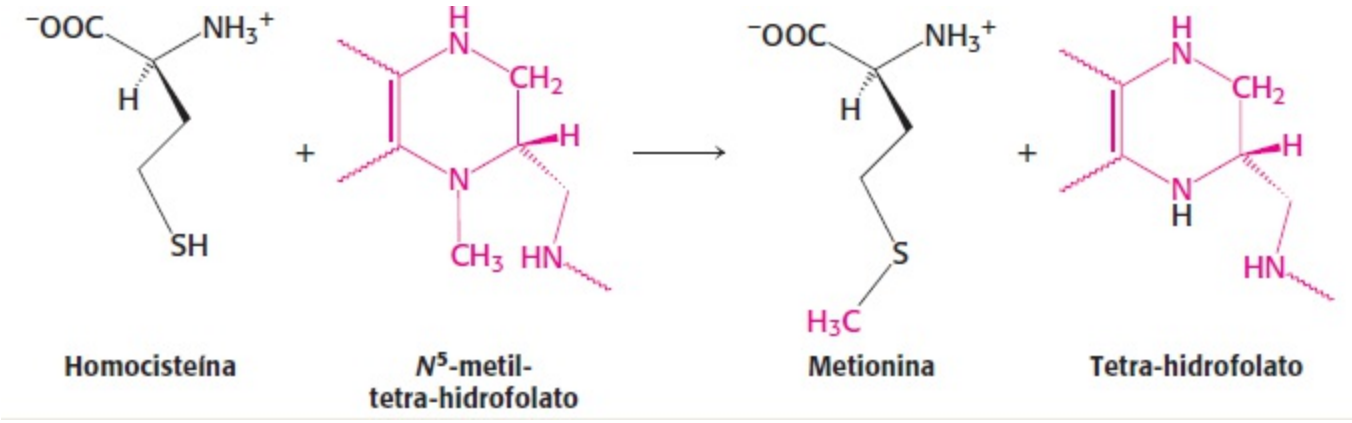
O tetra-hidrofolato pode transportar um grupo metila em seu átomo N-5, porém o seu potencial de transferência não é alto o suficiente para a maioria das metilações de biossíntese. Na verdade, o doador de metila ativado é habitualmente a S-*adenosilmetionina* (SAM), que é sintetizada pela transferência de um grupo adenosila do ATP para o átomo de enxofre da metionina.



O grupo metila da unidade de metionina é ativado pela carga positiva no átomo de enxofre adjacente, tornando a molécula muito mais reativa do que o N^5-metil-tetra-hidrofolato. A síntese de *S*-adenosilmetionina é incomum, visto que o grupo trifosfato do ATP é clivado em pirofosfato e ortofosfato; o pirofosfato é subsequentemente hidrolisado a duas moléculas de P_i. Ocorre formação de S-*adenosil homocisteína* quando o grupo metila da *S*-adenosilmetionina é transferido para um aceptor. Em seguida, a *S*-adenosil-homocisteína é hidrolisada a *homocisteína* e adenosina.



A metionina pode ser regenerada pela transferência de um grupo metila do N^5-metil-tetra-hidrofolato para homocisteína em uma reação catalisada pela *metionina sintase* (também conhecida como *homocisteína metiltransferase*).



A coenzima que medeia essa transferência de um grupo metila é a *metilcobalamina*, derivada da vitamina B_{12}. Com efeito, essa reação e o rearranjo da L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA (p. 654), catalisados por uma enzima homóloga, são as duas únicas reações dependentes de vitamina B_{12} conhecidas que ocorrem nos mamíferos. Em muitos organismos, existe também outra enzima que converte a homocisteína em metionina sem vitamina B_{12}.

Essas reações constituem o denominado *ciclo da metila ativada* (Figura 24.11). Os grupos metila entram no ciclo na conversão da homocisteína em metionina e, em seguida, tornam-se altamente reativos pela adição de um grupo adenosila, o que faz com que os átomos de enxofre adquiram uma carga positiva e os grupos metila fiquem muito mais eletrofílicos. O alto potencial de transferência do grupo *S*-metila possibilita a sua transferência a uma ampla variedade de aceptores.

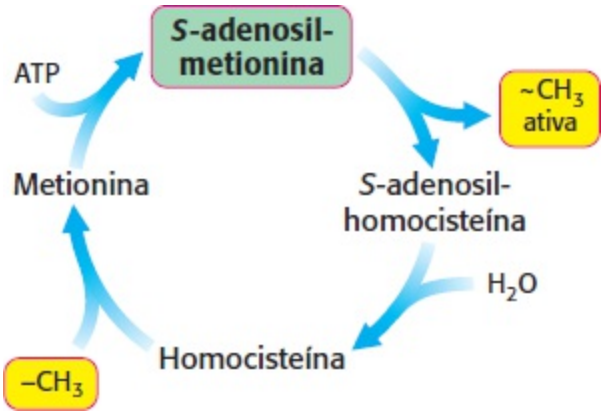


Figura 24.11 Ciclo da metila ativada. O grupo metila da metionina é ativado pela formação de *S*-adenosilmetionina.

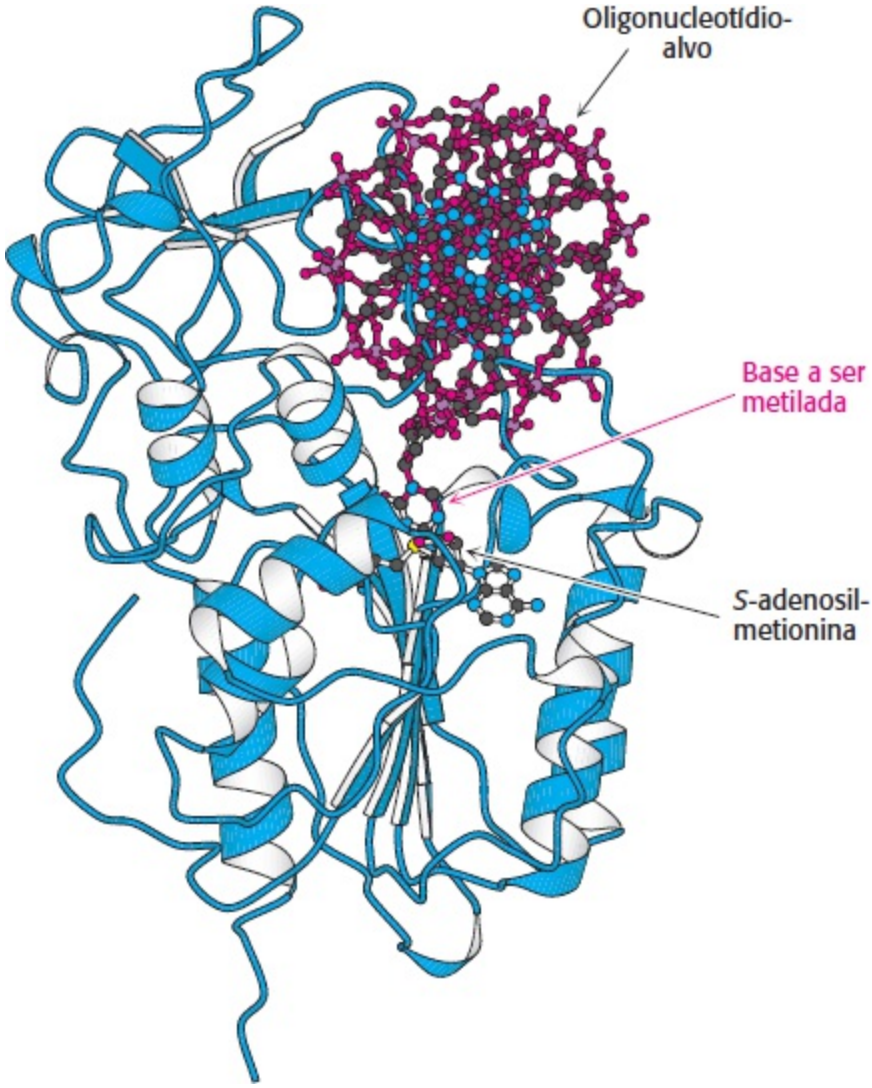
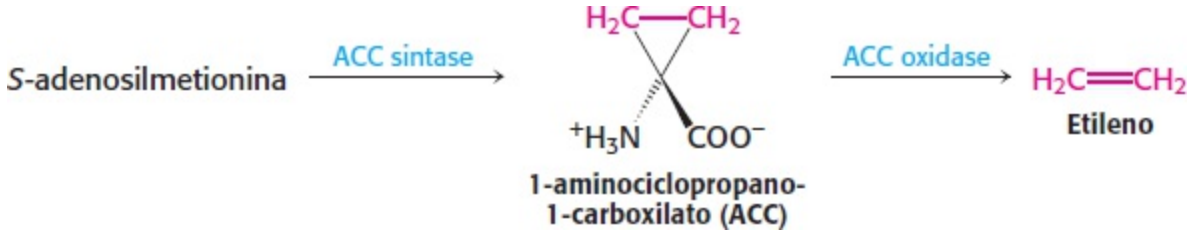


Figura 24.12 Metilação do DNA. A estrutura de uma DNA metilase ligada a um oligo-nucleotídio-alvo mostra que a base a ser metilada sai da dupla-hélice e entra no sítio ativo de uma metilase dependente de SAM. [Desenhada a partir de 10.MH.pdb.]

Entre os aceptores modificados pela *S*-adenosilmetionina estão as bases específicas do DNA. A metilação do DNA protege o DNA bacteriano da clivagem por enzimas de restrição (Seção 9.3). A base a ser metilada é movida para fora da dupla-hélice do DNA para dentro do sítio ativo de uma DNA metilase, onde pode aceitar um grupo metila da *S*-adenosilmetionina (Figura 24.12). Existe um domínio de ligação de *S*-adenosilmetionina recorrente em muitas metilases dependentes de SAM.

A *S*-adenosilmetionina também é um precursor do *etileno*, um hormônio vegetal gasoso que induz o amadurecimento das frutas. A *S*-adenosilmetionina é ciclizada a um derivado ciclopropano, que é então oxidado para formar etileno. O filósofo grego Theophrastus reconheceu, há mais de 2.000 anos, que os figos do sicômoro não amadurecem, a não ser que sejam raspados com uma ponta de ferro. Sabe-se, hoje em dia, o motivo disso: *o ferimento desencadeia a produção de etileno, que, por sua vez, induz o amadurecimento.* Muitos esforços estão sendo feitos para compreender essa via de biossíntese, visto que o etileno é um dos responsáveis pela deterioração das frutas.

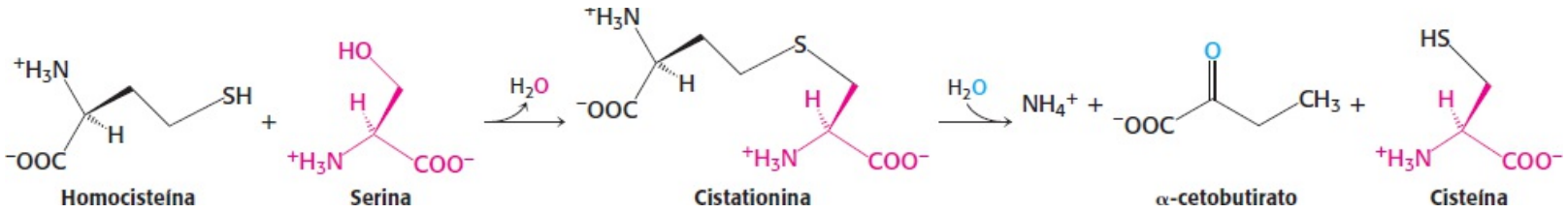


A cisteína é sintetizada a partir da serina e da homocisteína

Além de atuar como precursor da metionina no ciclo da metila ativada, a homocisteína é um intermediário na síntese de cisteína. A serina e a homocisteína condensam-se para formar a *cistationina.* Essa reação é catalisada pela *cistationina* β-*sintase.* Em seguida, a cistationina é desaminada e clivada a cisteína e α-cetobutirato pela *cistationina* γ-*liase* ou *cistationase.* Ambas as enzimas utilizam PLP e são homólogas à aspartato aminotransferase. A reação final é

$$\text{Homocisteína} + \text{serina} \leftrightharpoons \text{cisteína} + \alpha\text{-cetobutirato} + NH_4^+$$

Observe que o átomo de enxofre da cisteína deriva da homocisteína, enquanto o esqueleto de carbono provém da serina.



A homocisteína em níveis elevados exibe correlação com a doença vascular

Indivíduos com níveis séricos elevados de homocisteína ou do dímero de homocistina ligado por dissulfeto correm altíssimo risco de apresentar coronariopatia e arteriosclerose. A causa genética mais comum dos níveis elevados de homocisteína consiste em mutação no gene que codifica a cistationina β-sintase. A base molecular da ação da homocisteína ainda não foi elucidada, embora pareça lesionar as células que revestem os vasos sanguíneos e aumentar o crescimento do músculo liso vascular. O aminoácido também aumenta o estresse oxidativo. Os tratamentos com vitaminas mostram-se efetivos para reduzir os níveis de homocisteína em alguns indivíduos. O tratamento com vitaminas maximiza a atividade das duas principais vias metabólicas que processam a homocisteína. O piridoxal fosfato, um derivado da vitamina B_6, é necessário para a atividade da cistationina β-sintase, que converte a homocisteína em cistationa; o tetra-hidrofolato, bem como a vitamina B_{12}, sustenta a metilação da homocisteína em metionina.

O chiquimato e o corismato são intermediários na biossíntese de aminoácidos aromáticos

Discutiremos agora a biossíntese de aminoácidos essenciais. Esses aminoácidos são sintetizados por plantas e microrganismos; em última análise, aqueles encontrados na alimentação humana originam-se principalmente de plantas. Os aminoácidos essenciais são formados por vias muito mais complexas do que os aminoácidos não essenciais. As vias de síntese dos aminoácidos aromáticos nas bactérias foram selecionadas aqui para discussão, visto que são bem conhecidas e exemplificam temas recorrentes de mecanismo.

A fenilalanina, a tirosina e o triptofano são sintetizados por uma via comum em *E. coli* (Figura 24.13). A etapa inicial consiste na condensação do fosfoenolpiruvato (um intermediário glicolítico) com eritrose 4-fosfato (um intermediário da via das pentoses fosfato). O açúcar resultante de sete carbonos e com cadeia aberta é oxidado, perde o grupo fosforila e cicliza a 3-desidroquinato. Em seguida, a desidratação produz 3-desidrochiquimato, que é reduzido pela NADPH a chiquimato. A fosforilação do chiquimato pelo ATP produz chiquimato 3-fosfato, que se condensa com uma segunda molécula de fosfoenolpiruvato. O intermediário resultante, o 5-enolpiruvil, perde o seu grupo fosforila, produzindo corismato, o precursor comum de todos os três aminoácidos aromáticos. A importância dessa via é revelada pela eficiência do glifosato (comercialmente conhecido como Roundup), um herbicida de amplo espectro. Esse composto é um inibidor não competitivo da enzima, que produz 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato. Ele bloqueia a biossíntese de aminoácidos aromáticos nas plantas, porém é bastante atóxico em animais, visto que eles carecem da enzima.

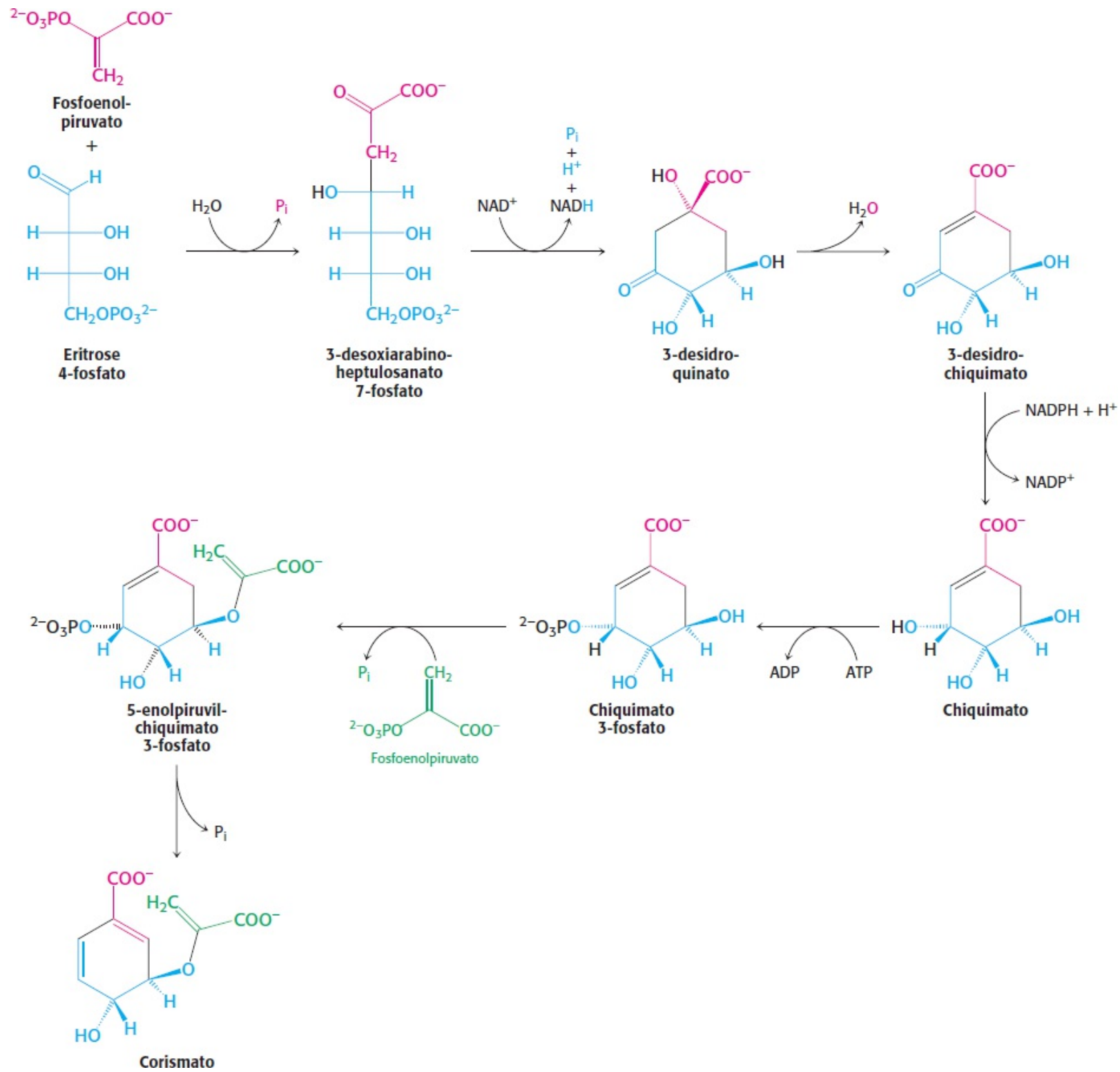
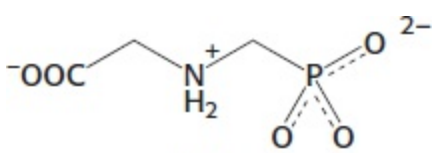


Figura 24.13 Via do corismato. O corismato é um intermediário na biossíntese da fenilalanina, tirosina e triptofano.



Glifosato
(Roundup)

A via bifurca-se no corismato. Analisemos inicialmente o *ramo do prefenato* (Figura 24.14). Uma mutase converte o corismato em prefenato, o precursor imediato do anel aromático da fenilalanina e tirosina. Essa conversão fascinante fornece um exemplo raro de reação eletrocíclica em bioquímica, cujo mecanismo se assemelha à conhecida reação de Diels-Alder em química orgânica. A

desidratação e a descarboxilação produzem *fenilpiruvato.* De modo alternativo, o prefenato pode sofrer descarboxilação oxidativa a p-*hidroxifenilpiruvato.* Em seguida, esses α-cetoácidos são transaminados, formando *fenilalanina* e *tirosina.*

O ramo que inicia com o *antranilato* leva à síntese do triptofano (Figura 24.15). O corismato adquire um grupo amino proveniente da hidrólise da cadeia lateral da glutamina e libera piruvato, com formação de antranilato. Em seguida, o antranilato condensa-se com o *5-fosforribosil-1-pirofosfato* (PRPP), *uma forma ativa* de *ribose fosfato.* O PRPP também constitui um importante intermediário na síntese de histidina, de nucleotídios pirimidínicos e nucleotídios purínicos (Seções 25.1 e 25.2). O átomo C-1 da ribose 5-fosfato liga-se ao átomo de nitrogênio do antranilato, em uma reação que é impulsionada pela liberação e hidrólise de pirofosfato. A ribose do fosforribosilantranilato sofre um rearranjo, produzindo 1-(*o*-carboxifenilamino)-1-desoxirribulose-5-fosfato. Esse intermediário é desidratado e, em seguida, descarboxilado a indol-3-glicerol fosfato, que é clivado a indol. Em seguida, o indol reage com a serina para formar triptofano. Nessas etapas finais, que são catalisadas pela triptofano sintase, a cadeia lateral do indol-3-glicerol fosfato é removida na forma de gliceraldeído 3-fosfato e substituída pelo esqueleto de carbono da serina

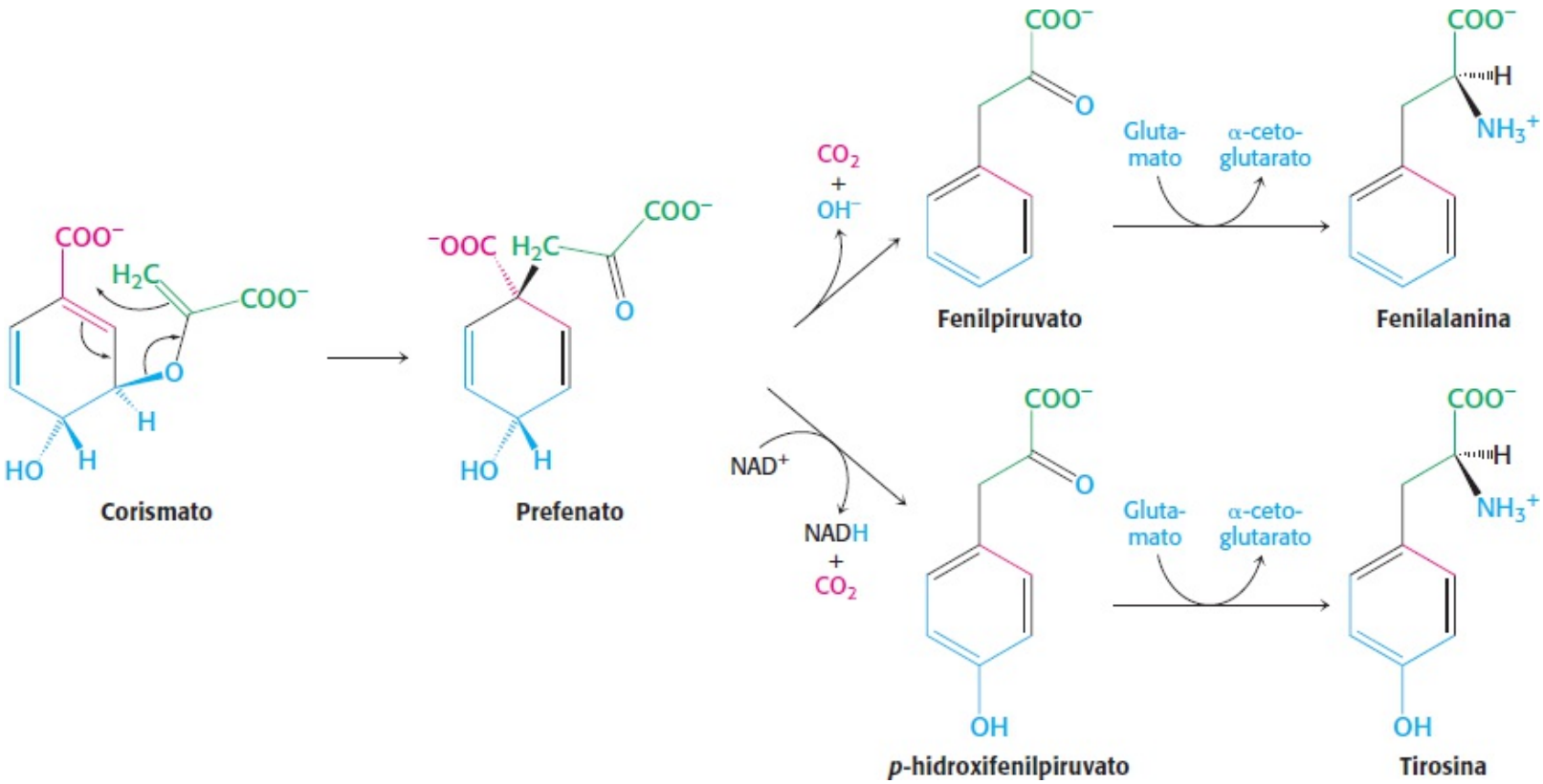


Figura 24.14 Síntese da fenilalanina e da tirosina. O corismato pode ser convertido em prefenato, que é subsequentemente convertido em fenilalanina e tirosina.

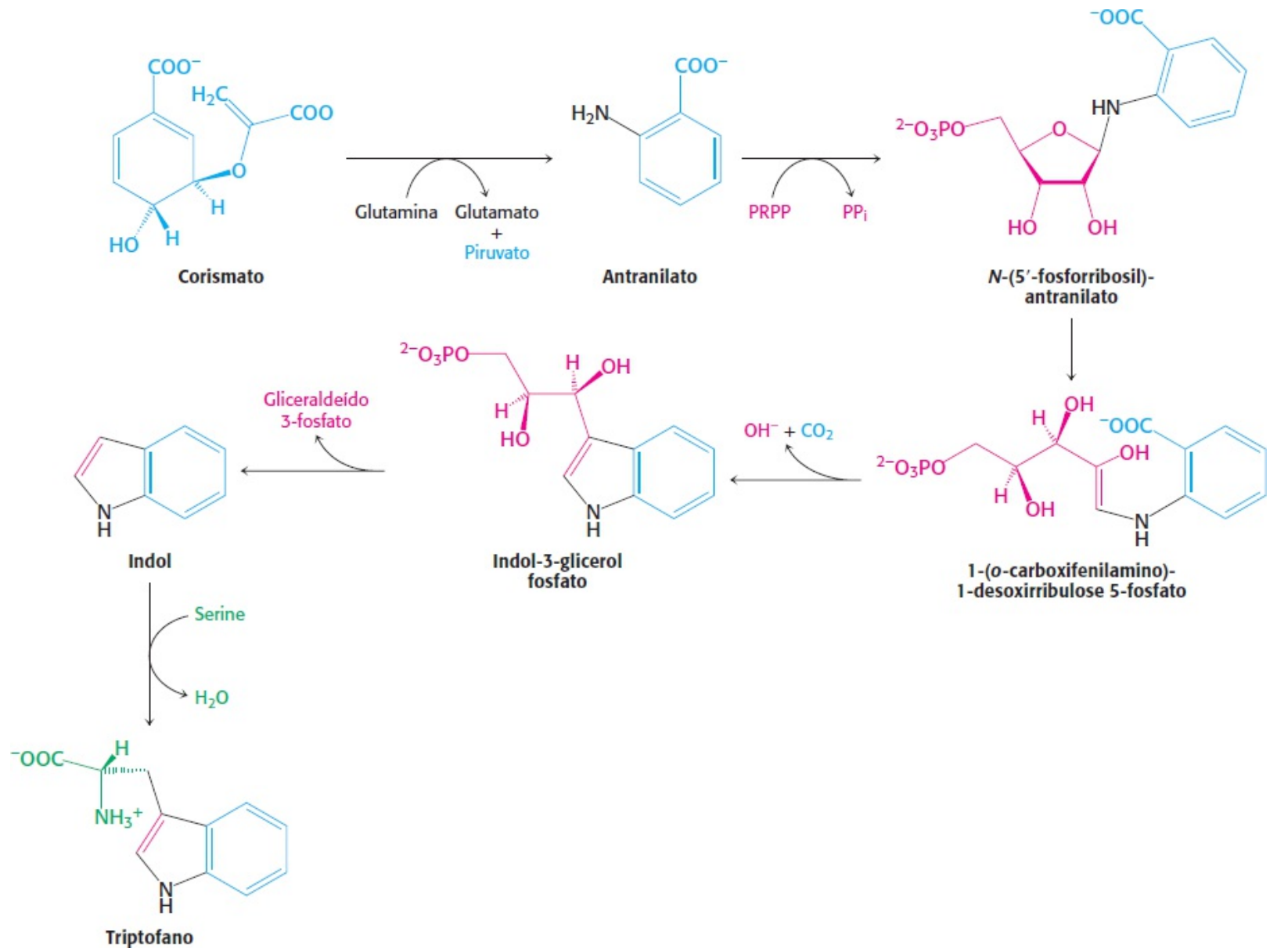
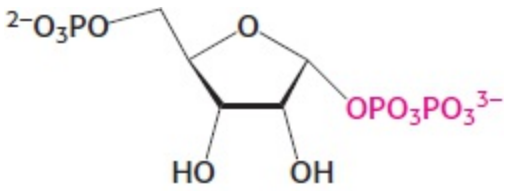
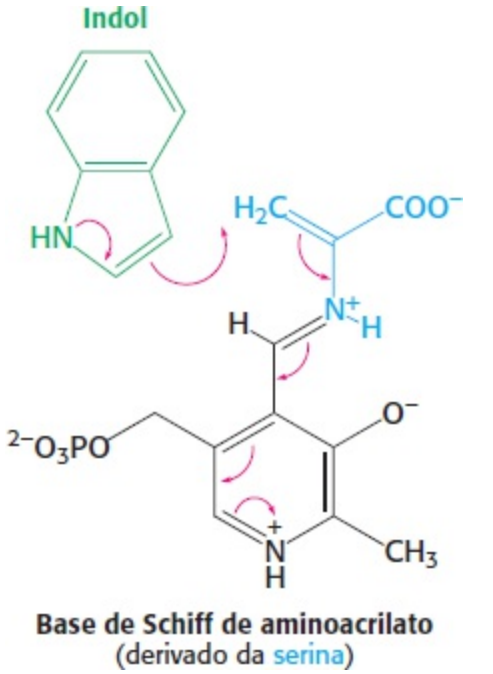


Figura 24.15 Síntese do triptofano. O corismato pode ser convertido em antranilato, que é subsequentemente convertido em triptofano.



A triptofano sintase ilustra a canalização do substrato na catálise enzimática

A enzima triptofano *sintase de E. coli*, um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$, pode ser dissociada em duas subunidades α e um dímero β_2 (Figura 24.16). A subunidade α catalisa a formação de indol a partir do indol 3-glicerol fosfato, enquanto cada subunidade β apresenta um sítio ativo contendo PLP, que catalisa a condensação do indol com a serina, formando triptofano. A serina forma uma base de Schiff com esse PLP, que é então desidratado, produzindo a *base de Schiff de aminoacrilato*. Esse intermediário reativo é atacado pelo indol, produzindo triptofano. A estrutura tridimensional global dessa enzima é distinta daquela da aspartato aminotransferase e das outras enzimas com PLP já discutidas.



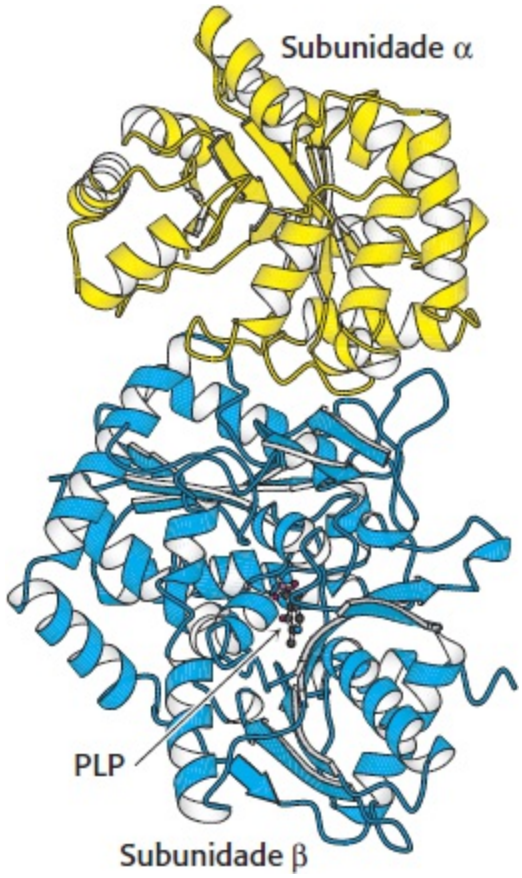


Figura 24.16 Estrutura da triptofano sintase. A estrutura do complexo formado por uma subunidade α (amarelo) e uma subunidade β (azul). *Observe* que o piridoxal fosfato (PLP) está ligado profundamente dentro da subunidade β, a uma distância considerável da subunidade α. [Desenhada a partir de 1BKS.pdb.]

A síntese de triptofano representa um desafio. O indol, uma molécula hidrofóbica, atravessa prontamente as membranas e seria perdido da célula se conseguisse se difundir para fora da enzima. Esse problema é engenhosamente resolvido. Um canal de 25 Å de comprimento liga o sítio ativo da unidade α com o da subunidade β adjacente no tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ (Figura 24.17). Por conseguinte, o indol pode difundir-se de um sítio ativo para o outro sem ser liberado no solvente. Experimentos com marcação isotópica mostraram que o indol formado pela subunidade α não deixa a enzima quando a

serina está presente. Além disso, as duas reações parciais são coordenadas. O indol não é formado pela subunidade α até que o aminoacrilato altamente reativo esteja pronto e aguardando na subunidade β. Vemos aqui um exemplo bem definido de *canalização de substrato na catálise* por um complexo multienzimático. A canalização aumenta substancialmente a velocidade catalítica. Além disso, evita-se a ocorrência de uma reação colateral deletéria – neste caso, a perda potencial de um intermediário. Encontraremos outros exemplos de canalização de substrato no Capítulo 25.

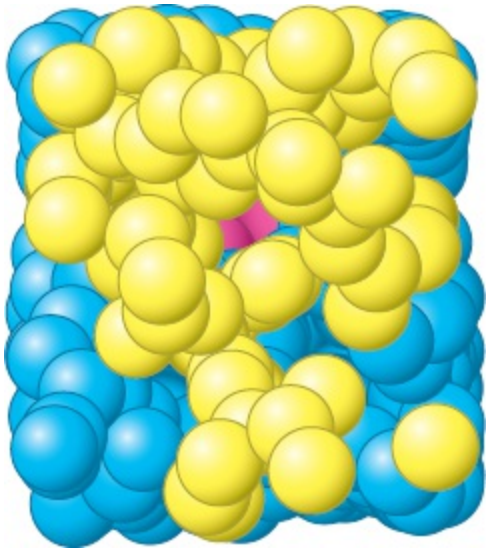


Figura 24.17 Canalização do substrato. Um túnel de 25 Å estende-se do sítio ativo da subunidade α da triptofano sintase (amarelo) até o cofator PLP (vermelho) no sítio ativo da subunidade β (azul).

24.3 A biossíntese de aminoácidos é regulada por inibição por retroalimentação

A velocidade de síntese dos aminoácidos depende principalmente das *quantidades* das enzimas de biossíntese e de suas *atividades*. Analisaremos agora o controle da atividade enzimática. A regulação da síntese de enzimas será discutida no Capítulo 31.

Em uma via de biossíntese, a primeira reação irreversível, denominada *etapa comprometida*, constitui habitualmente um importante local de regulação. O produto final da via (Z) frequentemente inibe a enzima que catalisa a etapa comprometida ($A \rightarrow B$).

Esse tipo de controle é essencial para a conversão das unidades básicas de construção e da energia metabólica. Considere a biossíntese da serina (p. 720). A etapa comprometida nessa via é a oxidação do 3-fosfoglicerato, que é catalisada pela enzima *3-fosfoglicerato desidrogenase*. A enzima de *E. coli* é um tetrâmero de quatro subunidades idênticas, compreendendo, cada uma delas, um domínio catalítico e um domínio regulatório de ligação de serina (Figura 24.18). A ligação da serina a um sítio regulatório diminui o valor de $V_{máx.}$ para a enzima; uma enzima ligada a quatro moléculas de serina é essencialmente inativa. Por conseguinte, se a serina estiver presente em quantidades

abundantes na célula, a atividade da enzima será inibida, de modo que o 3-fosfoglicerato, uma unidade básica essencial de construção que pode ser usada em outros processos, não seja desperdiçado.

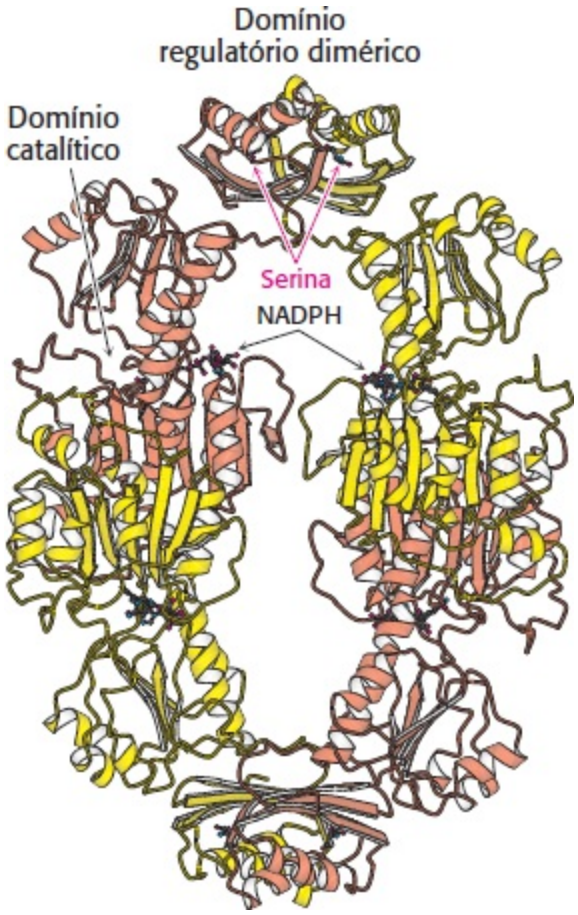


Figura 24.18 Estrutura da 3-fosfoglicerato desidrogenase. Esta enzima, que catalisa a etapa comprometida na via de biossíntese da serina, é inibida pela serina. *Observe* os dois domínios regulatórios diméricos de ligação da serina – um na parte superior e outro na parte inferior da estrutura. [Desenhada a partir de 1PSD.pdb.]

As vias ramificadas necessitam de regulação sofisticada

A regulação das vias ramificadas é mais complicada, visto que a concentração de dois produtos precisa ser considerada. Com efeito, foram identificados vários mecanismos complexos de retroalimentação nas vias ramificadas de biossíntese.

Inibição por retroalimentação e ativação. Duas vias com uma etapa inicial comprometida podem ser, cada uma delas, inibidas pelo seu próprio produto e ativadas pelo produto da outra via. Considere, por exemplo, a biossíntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina. Um intermediário comum, a hidroxietil tiamina pirofosfato (hidroxietil-TPP; Seção 17.1), inicia as vias que levam a todos os três aminoácidos. A hidroxietil-TPP reage com o α-cetobutirato na etapa inicial da síntese da isoleucina. De modo alternativo, a hidroxietil-TPP reage com piruvato na etapa comprometida das vias que levam à valina e à leucina. Por conseguinte, as concentrações relativas de α-cetobutirato e de piruvato determinam a quantidade de isoleucina produzida em comparação com a produção de valina e de leucina. A *treonina desaminase*, a enzima com PLP que catalisa a formação do α-cetobutirato, é inibida alostericamente pela isoleucina (Figura 24.19). Essa enzima também é ativada de modo alostérico pela valina. Por conseguinte, essa enzima é inibida pelo

produto final da via que ela inicia e é ativada pelo produto final de uma via competitiva. Esse mecanismo equilibra as quantidades de diferentes aminoácidos que são sintetizados.

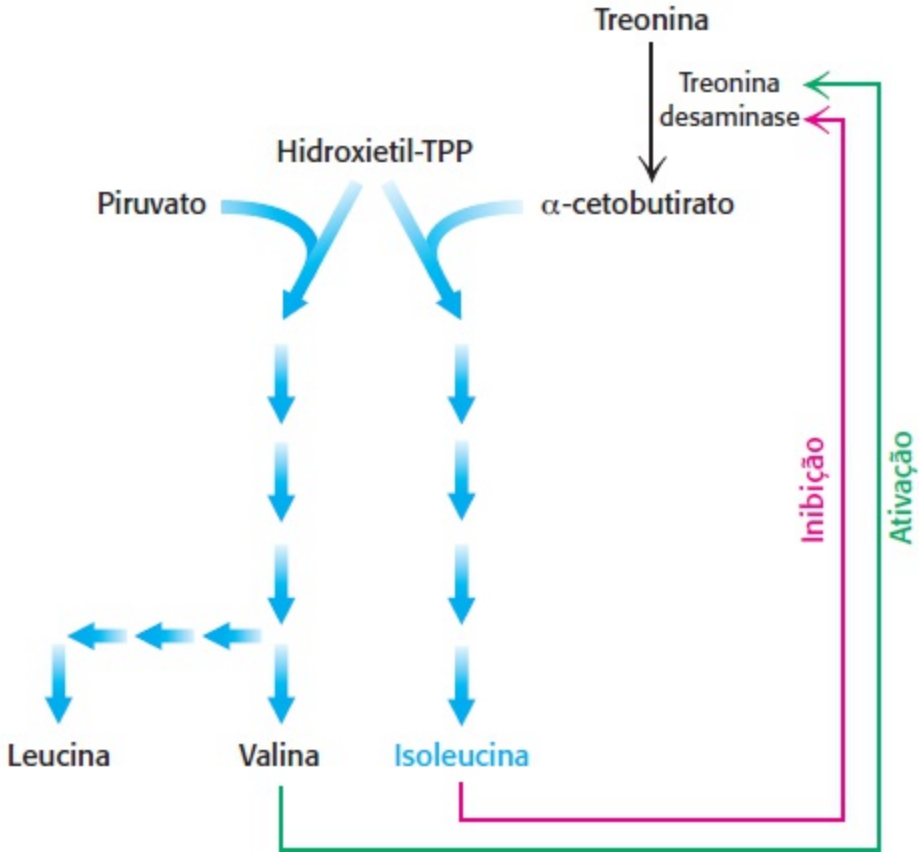


Figura 24.19 Regulação da treonina desaminase. A treonina é convertida em α-cetobutirato na etapa comprometida, levando à síntese de isoleucina. A enzima que catalisa essa etapa, a treonina desaminase, é inibida pela isoleucina e ativada pela valina, o produto de uma via paralela.

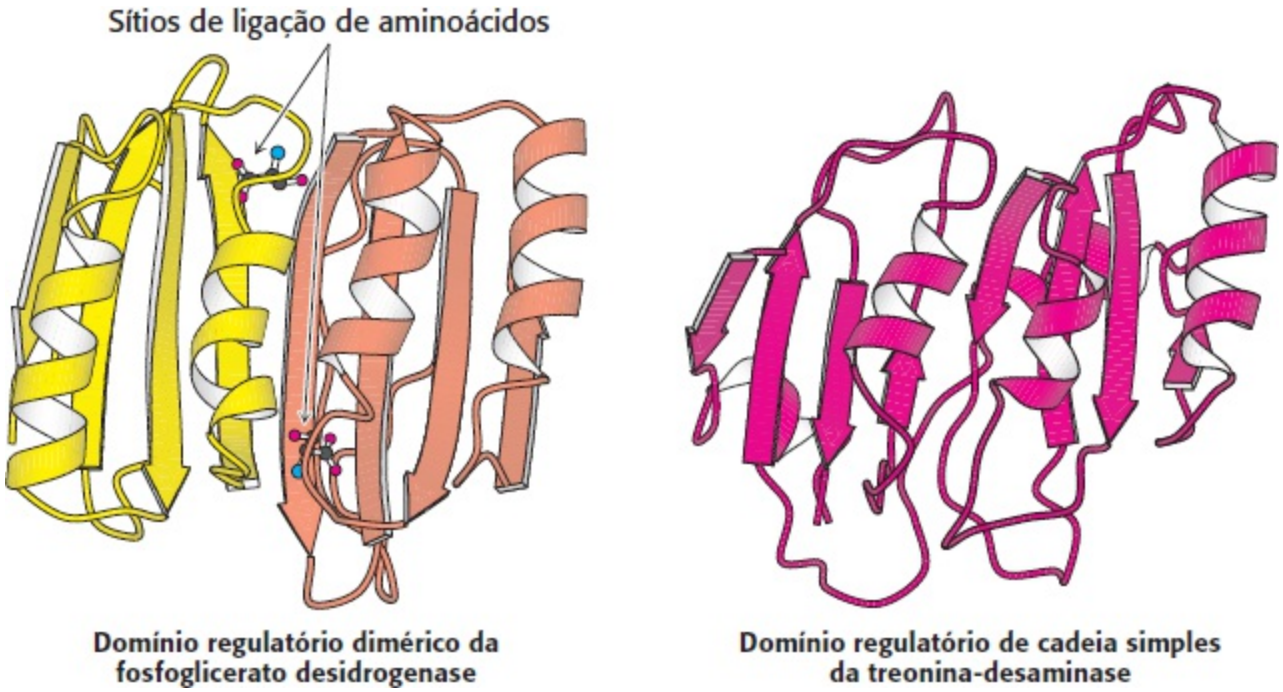


Figura 24.20 Domínio regulatório recorrente. O domínio regulatório formado por duas subunidades de 3-fosfoglicerato desidrogenase está estruturalmente relacionado com o domínio regulatório de cadeia simples da treonina desaminase. *Observe* que ambas as estruturas apresentam quatro hélices α e oito fitas β em locais semelhantes. Análises de sequência revelaram que esse domínio regulatório de ligação de aminoácido também está presente em outras enzimas. [Desenhada a partir de 1PSD e 1TDJ.pdb.]

O domínio regulatório da treonina desaminase assemelha-se muito, na sua estrutura, ao domínio regulatório da 3-fosfoglicerato desidrogenase (Figura 24.20). Nesta última enzima, os domínios regulatórios de duas subunidades interagem, formando uma unidade regulatória dimérica de ligação de serina, de modo que a enzima tetramérica contém duas dessas unidades regulatórias. Cada unidade é capaz de ligar-se a duas moléculas de serina. Na treonina desaminase, os dois domínios regulatórios se fundem em uma única unidade com dois sítios diferenciados de ligação de aminoácidos, um para a isoleucina e o outro para a valina. A análise de sequência mostra que existem domínios regulatórios semelhantes em outras enzimas de biossíntese de aminoácidos. *As semelhanças sugerem a possível evolução de processos de inibição por retroalimentação pela ligação de domínios regulatórios específicos aos domínios catalíticos das enzimas de biossíntese.*

Multiplicidade enzimática. A etapa comprometida pode ser catalisada por duas ou mais enzimas com diferentes propriedades de regulação. Por exemplo, a fosforilação do aspartato constitui a etapa comprometida na biossíntese de treonina, metionina e lisina. Essa reação em *E. coli* é catalisada por três aspartato quinases distintas (Figura 24.21). Os domínios catalíticos dessas enzimas exibem uma identidade de sequência de aproximadamente 30%. Embora os mecanismos de catálise sejam essencialmente idênticos, suas atividades são reguladas de modo diferente. Uma enzima não está sujeita a inibição por retroalimentação, outra é inibida pela treonina e a terceira é inibida pela lisina. Por conseguinte, uma regulação aprimorada também pode evoluir pela duplicação dos genes que codificam as enzimas de biossíntese.

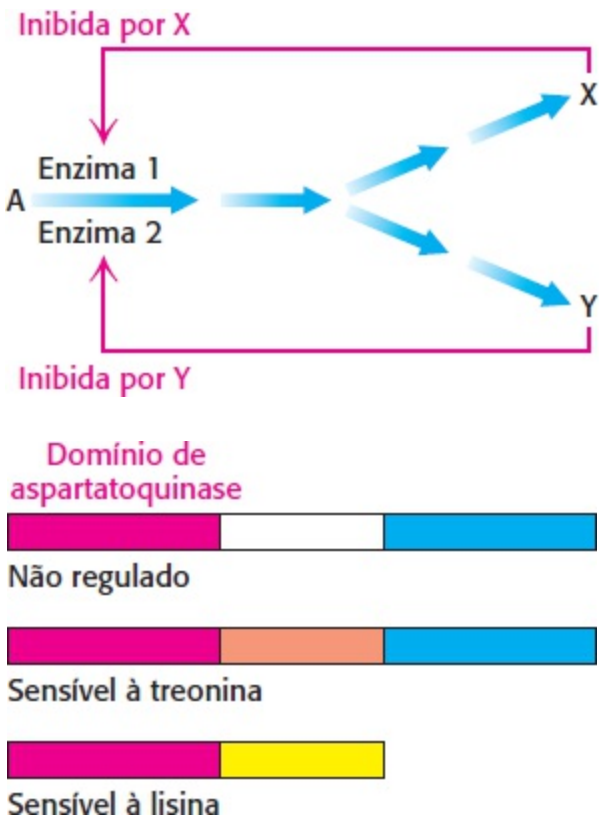


Figura 24.21 Estruturas de domínios de três aspartato quinases. Cada uma catalisa a etapa comprometida na biossíntese de um aminoácido diferente: metionina (em cima), treonina (no centro) e lisina (embaixo). Elas apresentam um domínio catalítico em comum, porém diferem nos seus domínios reguladores.

Inibição por retroalimentação cumulativa. Uma etapa comum é parcialmente inibida por cada um dos produtos finais, atuando de modo independente. A regulação da glutamina sintetase em *E. coli*

fornece um notável exemplo de inibição por retroalimentação cumulativa. Convém lembrar que a glutamina é sintetizada a partir de glutamato, NH_4^+ e ATP. A *glutamina sintetase* é constituída de 12 subunidades idênticas de 50 kDa, dispostas em dois anéis hexagonais um defronte ao outro. Earl Stadtman mostrou que essa enzima regula o fluxo de nitrogênio e, portanto, desempenha um papel essencial no controle do metabolismo bacteriano. O grupo amida da glutamina constitui uma fonte de nitrogênio na biossíntese de uma variedade de compostos, como triptofano, histidina, carbamoil fosfato, glicosamina 6-fosfato, citidina trifosfato e adenosina monofosfato. A glutamina sintetase é inibida cumulativamente por cada um desses produtos finais do metabolismo da glutamina, bem como pela alanina e glicina. *Na inibição cumulativa, cada inibidor pode reduzir a atividade da enzima, mesmo quando outros inibidores estão ligados em níveis de saturação.* A atividade enzimática da glutamina sintetase é desligada quase totalmente quando todos os produtos finais estão ligados à enzima.

A atividade da glutamina sintetase é modulada por uma cascata enzimática

A atividade da glutamina sintetase também é controlada por *modificação covalente reversível* – a fixação de uma *unidade de AMP* por uma ligação fosfodiéster ao grupo hidroxila de um resíduo de tirosina específico em cada subunidade (Figura 24.22). *Essa enzima adenilada é menos ativa e mais suscetível à inibição por retroalimentação cumulativa do que a forma desadenilada.* A unidade de AMP fixada covalentemente é removida da enzima adenilada por fosforólise. A fixação de uma unidade de AMP constitui a etapa final de uma cascata enzimática que é iniciada várias etapas antes por reagentes e produtos imediatos na síntese de glutamina.

As reações de adenilação e de fosforólise são catalisadas pela mesma enzima, a *adenilil transferase.* A análise de sequência indica que essa adenilil transferase é constituída de duas metades homólogas, sugerindo que uma metade catalisa a reação de adenilação, enquanto a outra metade seja responsável pela reação de desadenilação fosfolítica. O que determina se uma unidade de AMP é acrescentada ou removida? A especificidade da adenilil transferase é controlada por uma *proteína reguladora* (designada como P ou P_{II}), uma proteína trimérica que pode existir em duas formas, P_A e P_D. O complexo de P_A com adenilil transferase catalisa a fixação de uma unidade de AMP à glutamina sintetase, o que reduz a sua atividade. Em contrapartida, o complexo de P_D com adenilil transferase remove o AMP da enzima adenilada.

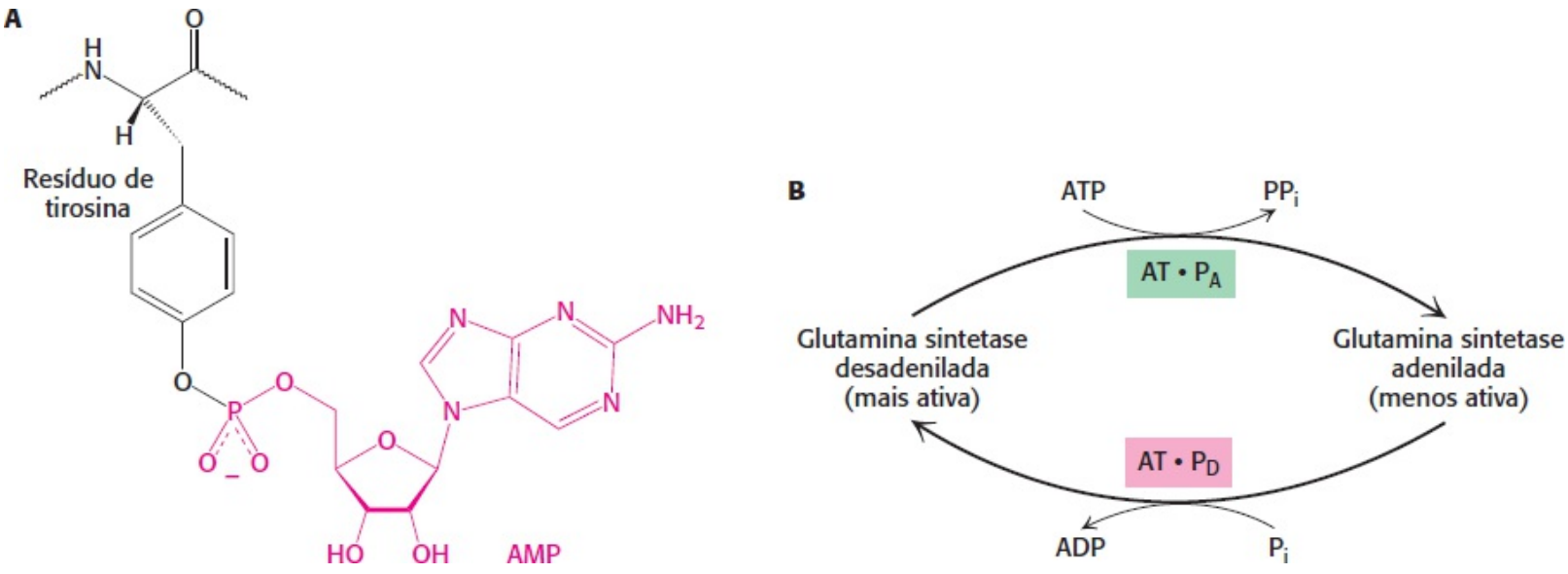


Figura 24.22 Regulação por adenilação. A. Um resíduo de tirosina específico em cada subunidade na glutamina sintetase é modificado por adenilação. **B.** A adenilação da tirosina é catalisada por um complexo de adenilil transferase (AT) e uma forma de uma proteína reguladora (P_A). A mesma catalisa a desadenilação quando forma um complexo com a outra forma (P_D) da proteína reguladora.

Isso nos remete a outro nível de modificação covalente reversível. A P_A é convertida em P_D pela fixação de uridina monofosfato a um resíduo específico de tirosina (Figura 24.23). Essa reação, que é catalisada pela *uridil transferase*, é estimulada pelo ATP e α-cetoglutarato, enquanto é inibida pela glutamina. Por sua vez, as unidades de UMP na P_D são removidas por hidrólise, em uma reação que é promovida pela glutamina e inibida pelo α-cetoglutarato. Essas atividades catalíticas opostas encontram-se em uma única cadeia polipeptídica, homóloga à adenilil transferase, e são controladas de modo que a enzima não catalise simultaneamente a uridilação e a hidrólise.

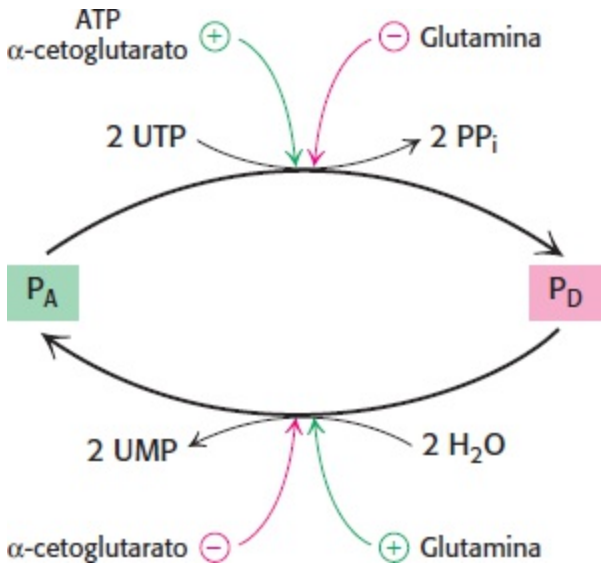


Figura 24.23 Um nível mais alto na cascata reguladora da glutamina sintetase. A P_A e P_D, as proteínas reguladoras que controlam a especificidade da adenilil transferase, são interconversíveis. A P_A é convertida em P_D por uridilação, que é revertida por hidrólise. As enzimas que catalisam essas reações são reguladas pelas concentrações dos intermediários metabólicos.

Por que uma cascata enzimática é usada para regular a glutamina sintetase? Uma das vantagens de uma cascata é que ela *amplifica sinais*, como na coagulação sanguínea e no controle do metabolismo do glicogênio. Outra vantagem é que *o potencial para controle alostérico é acentuadamente aumentado quando cada enzima na cascata é um alvo independente de regulação.* A integração do metabolismo do nitrogênio em uma célula exige que uma grande quantidade de sinais aferentes sejam detectados e processados. Além disso, a proteína reguladora P também participa na regulação da transcrição de genes para a glutamina sintetase e outras enzimas que atuam no metabolismo do nitrogênio. A evolução de uma cascata forneceu uma quantidade muito maior de locais de regulação e possibilitou uma sintonização mais precisa do fluxo de nitrogênio na célula.

24.4 Os aminoácidos são precursores de muitas biomoléculas

Além de serem as unidades básicas de construção das proteínas e dos peptídios, os aminoácidos atuam como precursores de muitos tipos de moléculas pequenas que desempenham papéis biológicos

importantes e diversos. Examinaremos brevemente algumas das biomoléculas que derivam de aminoácidos (Figura 24.24).

As *purinas* e as *pirimidinas* originam-se, em grande parte, de aminoácidos. A biossíntese desses precursores do DNA, do RNA e de numerosas coenzimas é discutida com mais detalhes no Capítulo 25. A extremidade reativa da *esfingosina*, um intermediário na síntese de esfingolipídios, provém da serina. A *histamina*, um potente vasodilatador, deriva da histidina por descarboxilação. A tirosina é um precursor dos hormônios *tiroxina* (tetraiodotironina) e *epinefrina*, bem como da *melanina*, um pigmento polimérico complexo. O neurotransmissor *serotonina* (5-hidroxitriptamina) e o *anel de nicotinamida* do NAD^+ são sintetizados a partir do triptofano. A seguir, analisaremos com mais detalhes três compostos bioquímicos particularmente importantes derivados de aminoácidos.

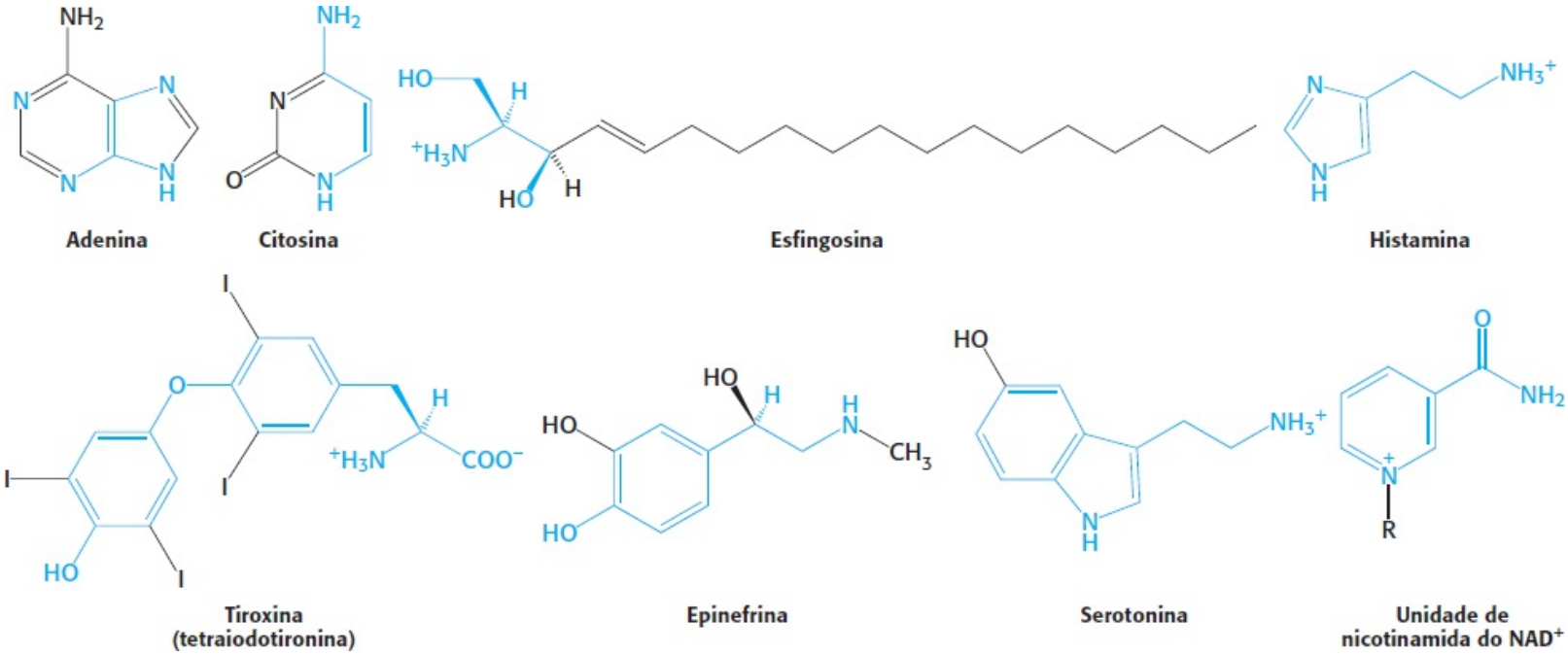


Figura 24.24 Biomoléculas selecionadas derivadas de aminoácidos. Os átomos derivados dos aminoácidos são mostrados em azul.

A glutationa, um gamaglutamil peptídio, atua como tampão de sulfidrilas e como antioxidante

A *glutationa*, um tripeptídio contendo um grupo sulfidrila, é um derivado altamente distinto de aminoácidos, que desempenha várias funções importantes (Figura 24.25).

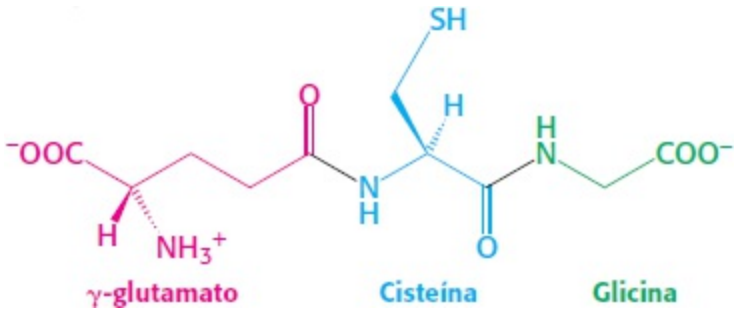


Figura 24.25 Glutationa. Esse tripeptídio é constituído de um resíduo de cisteína flanqueado por um resíduo de glicina e resíduo de glutamato ligado à cisteína por uma ligação isopeptídica entre o carboxilato da cadeia lateral do glutamato e o grupo amino da cisteína.

Por exemplo, a glutationa, que é encontrada em altos níveis (cerca de 5 mM) nas células animais, protege os eritrócitos da lesão oxidativa ao atuar como tampão de sulfidrilas (Seção 20.5). A glutationa alterna entre uma forma tiol reduzida (GSH) e uma forma oxidada (GSSG), em que dois tripeptídios estão ligados por uma ponte de dissulfeto.

$$2\ GSH + RO{-}OH \leftrightharpoons GSSG + H_2O + ROH$$

A GSSG é reduzida a GSH pela *glutationa redutase*, uma flavoproteína que utiliza NADPH como fonte de elétrons. Na maioria das células, a razão entre GSH e GSSG é superior a 500. *A glutationa desempenha um papel essencial na desintoxicação, uma vez que reage com o peróxido de hidrogênio e com peróxidos orgânicos, os subprodutos deletérios da vida aeróbica.*

A *glutationa peroxidase*, a enzima que catalisa essa reação, é notável por ter um aminoácido modificado contendo um átomo de *selênio* (Se) (Figura 24.26). Especificamente, o seu sítio ativo contém o análogo de cisteína com selênio, em que o selênio substitui o enxofre. A forma selenolato (E-Se^-) desse resíduo reduz o substrato de peróxido a um álcool e, por sua vez, é oxidada a ácido selenênico (E-SeOH). A seguir, a glutationa entra em ação ao formar um aduto seleno-sulfeto (E-Se-S-G). A seguir, uma segunda molécula de glutationa regenera a forma ativa da enzima ao atacar o seleno-sulfeto, formando glutationa oxidada (Figura 24.27).

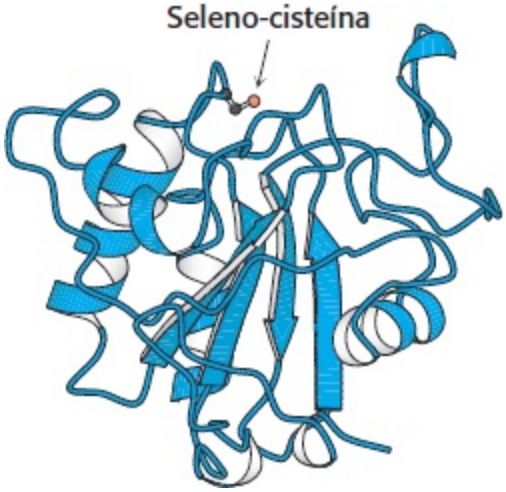


Figura 24.26 Estrutura da glutationa peroxidase. Esta enzima, que desempenha um papel na desintoxicação de peróxidos, contém um resíduo de seleno-cisteína em seu sítio ativo. [Desenhada a partir de 1GP1.pdb.]

O óxido nítrico, uma molécula sinalizadora de vida curta, é formado a partir da arginina

O *óxido nítrico* (NO) é um importante mensageiro em muitos processos de transdução de sinais em vertebrados. Por exemplo, o NO estimula a biogênese mitocondrial. Esse radical livre gasoso é produzido de modo endógeno a partir da *arginina*, em uma reação complexa que é catalisada pela *óxido nítrico sintase*. O NADPH e o O_2 são necessários para a sua síntese (Figura 24.28). O óxido nítrico atua ligando-se e ativando a guanilato ciclase solúvel, uma enzima importante na transdução de sinais (Seção 32.3). Essa enzima é homóloga à adenilato ciclase, porém inclui um domínio contendo heme que se liga ao NO.

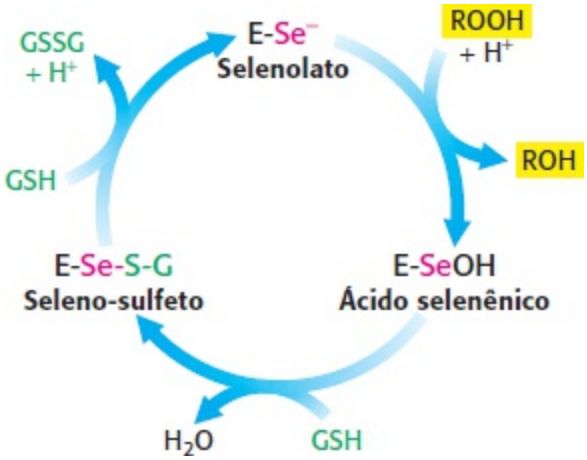


Figura 24.27 Ciclo catalítico da glutationa peroxidase. [De O. Epp, R. Ladenstein e A. Wendel. *Eur. J. Biochem.* 133(1983):51-69.]

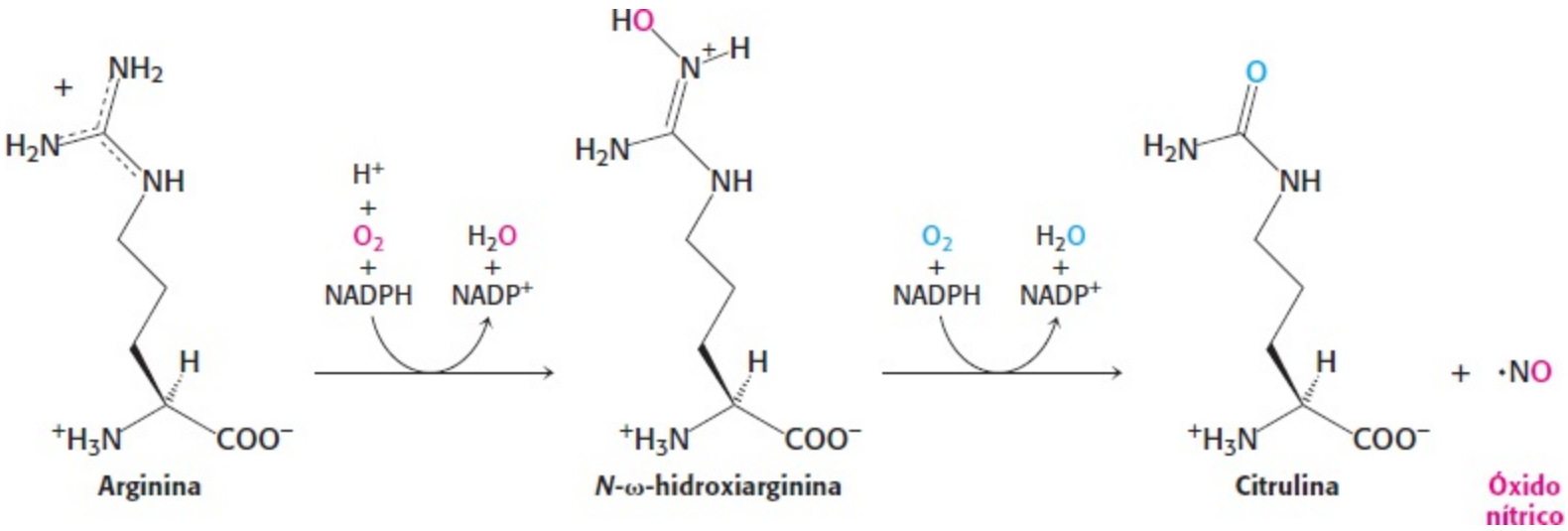


Figura 24.28 Formação do óxido nítrico. O NO é produzido pela oxidação da arginina.

Marcação com ^{15}N: Relato de um pioneiro

"Eu mesmo como cobaia

... em 1944, realizei, juntamente com David Rittenberg, uma pesquisa sobre a renovação das proteínas sanguíneas dos seres humanos. Para esse propósito, sintetizei 66 g de glicina marcada com 35% de ^{15}N, a um custo de $1.000 dólares pelo ^{15}N. Em 12 de fevereiro de 1945, iniciei a ingestão da glicina marcada. Como não sabíamos o efeito de doses relativamente grandes do isótopo estável do nitrogênio, e como acreditávamos que a incorporação máxima em proteínas poderia ser obtida pela administração de glicina de modo contínuo, ingeri amostras de 1 g de glicina a intervalos de 1 h durante as 66 h seguintes...

A intervalos determinados, foi coletada uma amostra de sangue e, após preparação adequada, foram determinadas as concentrações de ^{15}N em diferentes proteínas do sangue."

– David Shemin
Bioessays 10 (1989):30

As porfirinas são sintetizadas a partir da glicina e da succinil-coenzima A

A participação de um aminoácido na biossíntese dos anéis de porfirina dos hemes e das clorofilas foi revelada pela primeira vez por experimentos de marcação isotópica realizados por David Shemin e colaboradores. Em 1945, eles mostraram que os átomos de nitrogênio do heme ficavam marcados após a ingestão de [^{15}N] glicina por seres humanos (dos quais Shemin foi o primeiro), enquanto a

ingestão de [^{15}N] glutamato resultava em pouca marcação.

Com o uso do ^{14}C, recentemente disponível na ocasião, descobriram que oito dos átomos de carbono do heme nos eritrócitos nucleados de pato provêm do átomo de carbono α da glicina, e nenhum do átomo de carbono carboxílico. Estudos subsequentes demonstraram que os outros 26 átomos de carbono do heme podem originar-se do acetato. Além disso, o ^{14}C na metila do acetato marcado emergiu em 24 desses átomos de carbono, enquanto o ^{14}C no acetato marcado na carboxila só apareceu nos outros dois (Figura 24.29).

Esse padrão de marcação altamente distinto levou Shemin a propor que, antes de sua incorporação no heme, o acetato é convertido em succinil-CoA por enzimas do ciclo do ácido cítrico (Seção 17.2). Shemin também postulou que ocorre formação de um precursor do heme pela condensação da glicina com succinil-CoA. De fato, a *primeira etapa na biossíntese de porfirinas nos mamíferos consiste na condensação da glicina com succinil-CoA para formar* Δ*-aminolevulinato.*

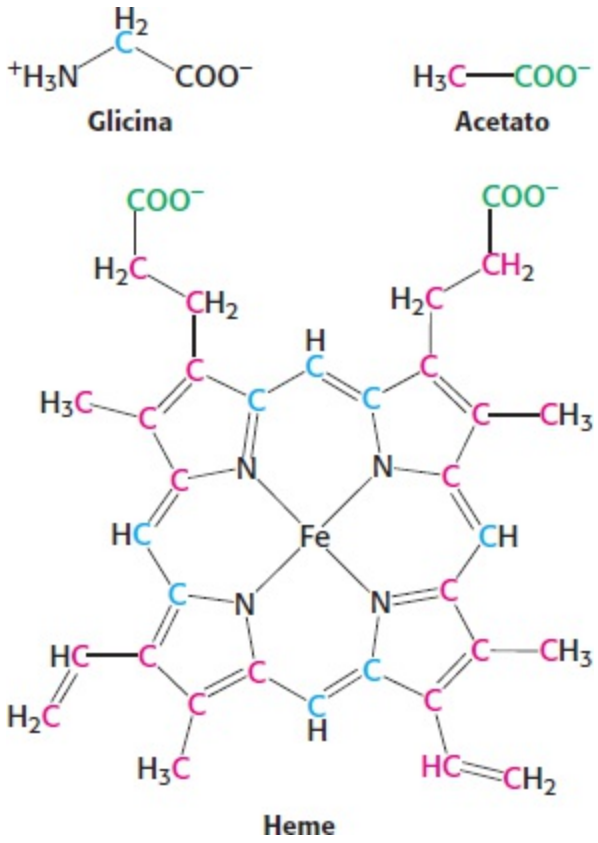
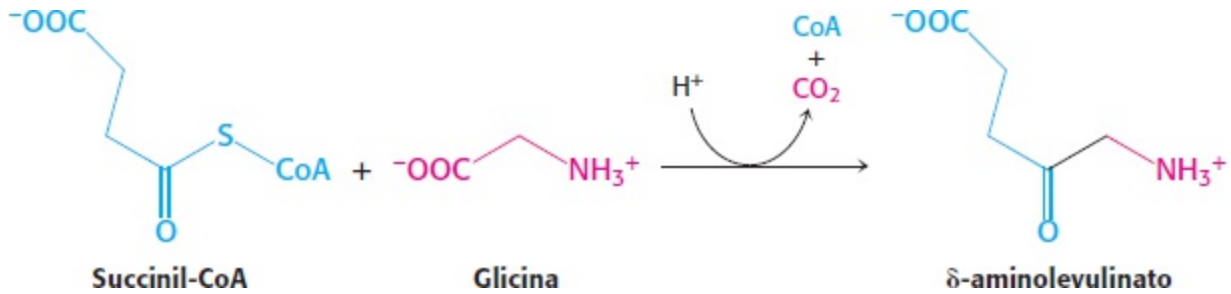


Figura 24.29 Marcação do heme. As origens dos átomos do heme foram reveladas pelos resultados de estudos de marcação isotópica.



Essa reação é catalisada pela δ-*aminolevulinato sintase*, uma enzima com PLP presente nas mitocôndrias. Em concordância com os estudos de marcação realizados por Shemin e colaboradores, o átomo de carbono do grupo carboxila da glicina é perdido na forma de dióxido de carbono, enquanto o carbono α permanece no δ-aminolevulinato.

Duas moléculas de δ-aminolevulinato condensam-se para formar o *porfobilinogênio*, o intermediário seguinte. Em seguida, ocorre condensação de quatro moléculas de porfobilinogênio da cabeça para a cauda, formando um *tetrapirrol* linear, em uma reação catalisada pela *porfobilinogênio desaminase.* Em seguida, o tetrapirrol linear ligado à enzima cicliza para formar o uroporfirinogênio III, que apresenta um arranjo assimétrico de cadeias laterais. Essa reação necessita de uma *cossintase.* Na presença apenas da sintase, ocorre produção de uroporfirinogênio I, o isômero simétrico não fisiológico. O uroporfirinogênio III também é um intermediário-chave na síntese de vitamina B_{12} pelas bactérias e de clorofila por bactérias e vegetais (Figura 24.30).

O esqueleto de porfirina está agora formado. As reações subsequentes alteram as cadeias laterais e o grau de saturação do anel porfirínico (ver Figura 24.29). O *coproporfirinogênio III* é formado pela descarboxilação das cadeias laterais de acetato. A dessaturação do anel porfirínico e a conversão de duas das cadeias laterais de propionato em grupos vinil produzem a *protoporfirina IX.* A quelação do ferro finalmente dá origem ao *heme*, o grupo prostético de diversas proteínas, como mioglobina, hemoglobina, catalase, peroxidase e citocromo *c*. A inserção da forma *ferrosa* do ferro é catalisada pela *ferro quelatase.* O ferro é transportado no plasma pela *transferrina*, uma proteína que se liga a dois íons férricos e é armazenada em tecidos dentro de moléculas de *ferritina.* A grande cavidade interna (cerca de 80 Å de diâmetro) da ferritina pode armazenar até 4.500 íons férricos (Seção 32.4).

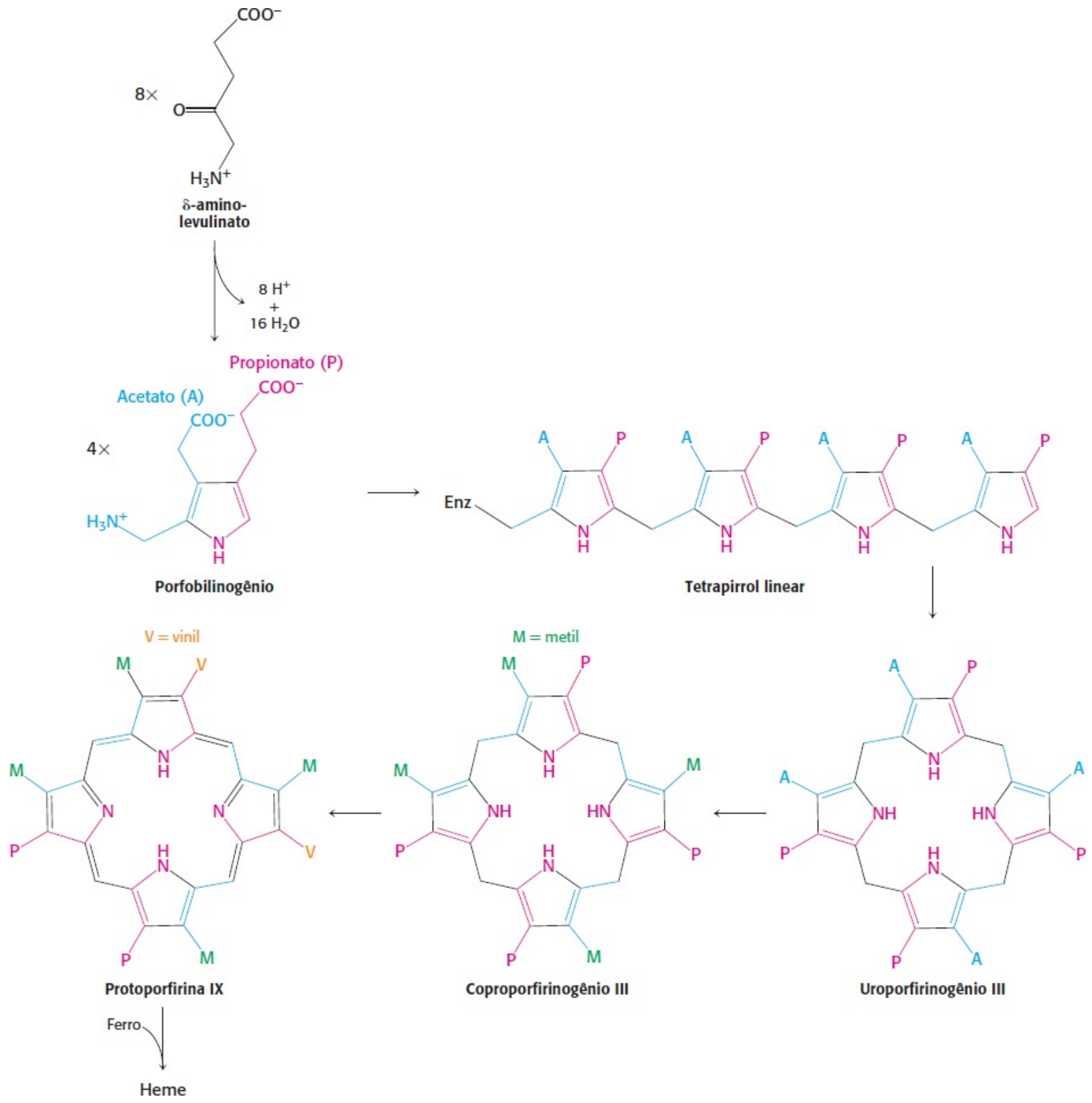


Figura 24.30 Via de biossíntese do heme. A via para a formação do heme começa com oito moléculas de δ-aminolevulinato.

Os eritrócitos humanos normais apresentam um tempo de vida médio de cerca de 120 dias, como foi demonstrado pela primeira vez por ocasião da sequência temporal do ^{15}N na hemoglobina do próprio Shemin após ter ingerido glicina marcada com ^{15}N. A primeira etapa na degradação do heme consiste na clivagem de sua ponte α-meteno para formar o pigmento verde, a *biliverdina*, um tetrapirrol linear. A ponte de meteno central da biliverdina é então reduzida pela *biliverdina redutase*, formando a *bilirrubina*, um pigmento vermelho (Figura 24.31). A mudança de cor de uma

equimose constitui um indicador altamente descritivo dessas reações de degradação.

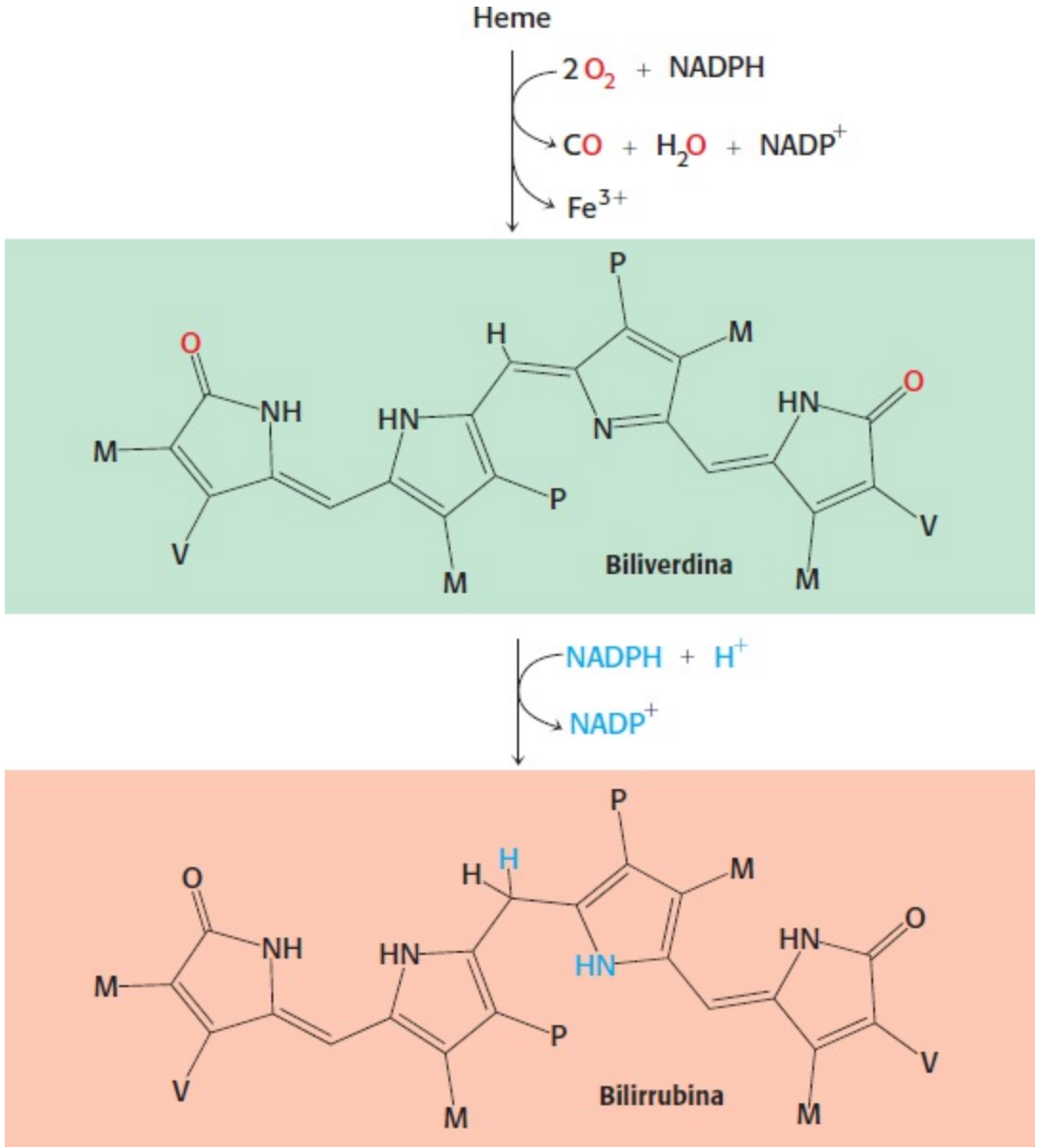


Figura 24.31 Degradação do heme. A formação dos produtos de degradação do heme, a biliverdina e a bilirrubina, é responsável pela cor das equimoses. M, metil; V, vinil.

As porfirinas acumulam-se em alguns distúrbios hereditários do seu metabolismo

As *porfirias* são distúrbios hereditários ou adquiridos, causados pela deficiência de enzimas na via de biossíntese do heme. A porfirina é sintetizada tanto nos eritroblastos quanto no fígado, e ambos podem constituir o local de distúrbio. Por exemplo, na *porfiria eritropoética congênita*, ocorre destruição prematura dos eritrócitos. Essa doença resulta da insuficiência de cossintase. Nessa porfiria, a síntese da quantidade necessária de uroporfirinogênio III é acompanhada da formação de quantidades muito grandes de uroporfirinogênio I, o isômero simétrico inútil. Ocorre também acúmulo de uroporfirina I, coproporfirina I e outros derivados simétricos. A urina de pacientes com essa doença é vermelha, devido à excreção de grandes quantidades de uroporfirina I. Seus dentes exibem forte fluorescência vermelha sob a luz ultravioleta, em virtude do depósito de porfirinas. Além disso, a sua pele é habitualmente muito sensível à luz, visto que as porfirinas fotoexcitadas são muito reativas. A *porfiria intermitente aguda* é a mais prevalente das porfirias, afetando o fígado. Essa porfiria caracteriza-se pela produção excessiva de

porfobilinogênio e δ-aminolevulinato, resultando em dor abdominal intensa e disfunção neurológica. Acredita-se que a "loucura" de George III, Rei da Inglaterra durante a revolução norte-americana, tenha sido devida a essa porfiria.

Resumo

24.1 Fixação do nitrogênio | Os microrganismos utilizam o ATP e um poderoso redutor para reduzir o nitrogênio atmosférico a amônia

Os microrganismos utilizam ATP e ferredoxina reduzida, um poderoso redutor, para reduzir o N_2 a NH_3. Um aglomerado de ferro-molibdênio na nitrogenase catalisa habilmente a fixação do N_2, uma molécula muito inerte. Os organismos superiores consomem o nitrogênio fixado para sintetizar aminoácidos, nucleotídios e outras biomoléculas contendo nitrogênio. Os principais pontos de entrada de NH_4^+ no metabolismo são a glutamina ou o glutamato.

24.2 Os aminoácidos são produzidos a partir de intermediários do ciclo do ácido cítrico e outras vias importantes

Os seres humanos são capazes de sintetizar 11 do conjunto básico de 20 aminoácidos. Esses aminoácidos são denominados não essenciais, em contraste com os aminoácidos essenciais, que precisam ser fornecidos pela alimentação. As vias de síntese dos aminoácidos não essenciais são muito simples. A glutamato desidrogenase catalisa a aminação redutora do α-cetoglutarato a glutamato. Ocorre uma reação de transaminação na síntese da maioria dos aminoácidos. Nessa etapa, a quiralidade do aminoácido é estabelecida. A alanina e o aspartato são sintetizados pela transaminação do piruvato e do oxaloacetato, respectivamente. A glutamina é sintetizada a partir do NH_4^+ e do glutamato, e a asparagina é sintetizada de modo semelhante. A prolina e a arginina originam-se do glutamato. A serina, formada a partir do 3-fosfoglicerato, é o precursor da glicina e da cisteína. A tirosina é sintetizada pela hidroxilação da fenilalanina, um aminoácido essencial. As vias de biossíntese dos aminoácidos essenciais são muito mais complexas do que as dos aminoácidos não essenciais.

O tetra-hidrofolato, um carreador de unidades de um carbono ativadas, desempenha um papel importante no metabolismo de aminoácidos e nucleotídios. Essa coenzima transporta unidades de um carbono em três estados de oxidação, que são interconversíveis: mais reduzido – metil; intermediário – metileno; e mais oxidado –formil, formimino e metenil. O principal doador de grupos de metila ativados é a *S*-adenosilmetionina, que é sintetizada pela transferência de um grupo adenosila do ATP para o átomo de enxofre da metionina. A *S*-adenosil-homocisteína é formada quando o grupo metila ativado é transferido para um aceptor. É hidrolisada a adenosina e homocisteína, e esta última é então metilada a metionina para completar o ciclo da metila ativada.

24.3 A biossíntese de aminoácidos é regulada por inibição por retroalimentação

A maioria das vias de biossíntese de aminoácidos é regulada por inibição por retroalimentação, em que a etapa comprometida é inibida alostericamente pelo produto final. A regulação de vias ramificadas exige uma extensa interação entre os ramos, incluindo regulação tanto negativa quanto positiva. A regulação da glutamina sintetase de *E. coli* fornece uma notável

demonstração de inibição por retroalimentação cumulativa e de controle por uma cascata de modificações covalentes reversíveis.

24.4 Os aminoácidos são precursores de muitas biomoléculas

Os aminoácidos são precursores de uma variedade de biomoléculas. A glutationa (γ-Glu-Cys-Gly) atua como tampão de sulfidrilas e como agente desintoxicante. A glutationa peroxidase, uma selenoenzima, catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos pela glutationa. O óxido nítrico, um mensageiro de vida curta, é formado a partir da arginina. As porfirinas são sintetizadas a partir da glicina e da succinil-CoA, que se condensam para produzir Δ-aminolevulinato. Ocorre ligação de duas moléculas desse intermediário, formando o porfobilinogênio. Quatro moléculas de porfobilinogênio combinam-se para formar um tetrapirrol linear, que cicliza a uroporfirinogênio III. A oxidação e modificações das cadeias laterais levam à síntese de protoporfirina IX, que adquire um átomo de ferro para formar o heme.

Palavras-chave

aminoácidos essenciais (p. 717)
aminoácidos não essenciais (p. 717)
canalização do substrato (p. 728)
ciclo da metila ativada (p. 723)
complexo de nitrogenase (p. 713)
etapa comprometida (p. 729)
fixação do nitrogênio (p. 712)
glutationa (p. 733)
inibição por retroalimentação cumulativa (p. 731)
multiplicidade enzimática (p. 730)
óxido nítrico (NO) (p. 733)
piridoxal fosfato (p. 718)
porfiria (p. 736)
S-adenosilmetionina (SAM) (p. 722)
tetra-hidrofolato (p. 721)

Questões

1. *Caído do céu.* Defina a fixação do nitrogênio. Que organelas são capazes de fixar o nitrogênio?

2. *De poucos a muitos.* Quais são os sete precursores dos 20 aminoácidos?

3. *Vital, em seu sentido mais verdadeiro.* Por que certos aminoácidos são definidos como essenciais para os seres humanos?

4. *De açúcar para aminoácido.* Escreva uma equação balanceada para a síntese de alanina a partir da glicose.

5. *Do ar para o sangue.* Quais são os intermediários no fluxo de nitrogênio do N_2 para o heme?

6. *Por trás dos panos.* "A complexidade operacional da nitrogenase é necessária, visto que a fixação do nitrogênio é um processo termodinamicamente desfavorável." Esta afirmação é verdadeira ou falsa? Explique.

7. *Componente comum.* Qual o cofator necessário para todas as transaminases (aminotransferases)?

8. *Guarde isso.* Neste capítulo, consideramos três cofatores/cossubstratos diferentes que atuam como carreadores de unidades de um carbono. Quais são eles?

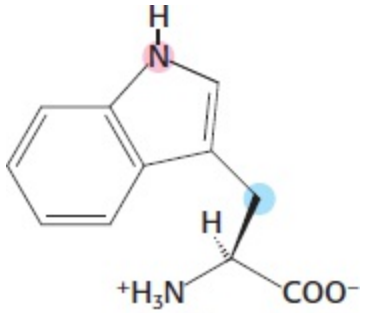
9. *Transferências de um carbono.* Que derivado do folato é um reagente na conversão de (a) glicina em serina? (b) homocisteína em metionina?

10. *Marcação denunciadora.* Na reação catalisada pela glutamina sintetase, um átomo de oxigênio é transferido da cadeia lateral do glutamato para o ortofosfato, conforme mostrado pelos resultados de estudos de marcação com ^{18}O. Explique esse achado.

11. *Marcação denunciadora, redux.* Diferentemente da produção de glutamina pela glutamina sintetase (ver Questão 10), a produção de asparagina a partir do aspartato marcado com ^{18}O não resulta na transferência de um átomo de ^{18}O para o ortofosfato. Em que molécula você espera encontrar um dos átomos de ^{18}O?

12. *Glicina terapêutica.* A acidemia isovalérica é um distúrbio hereditário do metabolismo da leucina, causada por deficiência de isovaleril-CoA desidrogenase. Muitos lactentes com essa doença morrem no primeiro mês de vida. A administração de grandes quantidades de glicina leva, algumas vezes, a uma acentuada melhora clínica. Proponha um mecanismo para a ação terapêutica da glicina.

13. *Dando uma mãozinha.* Os átomos do triptofano destacados provêm de outros dois aminoácidos. Quais são eles?



Triptofano

14. *Bactérias com privação.* As algas verde-azuladas (cianobactérias) formam *heterocistos* quando privadas de amônia e nitrato. Nessa forma, as cianobactérias carecem de núcleos e fixam-se a células vegetativas adjacentes. Os heterocistos apresentam atividade de fotossistema I, porém são totalmente desprovidos de atividade de fotossistema II. Qual é a sua função?

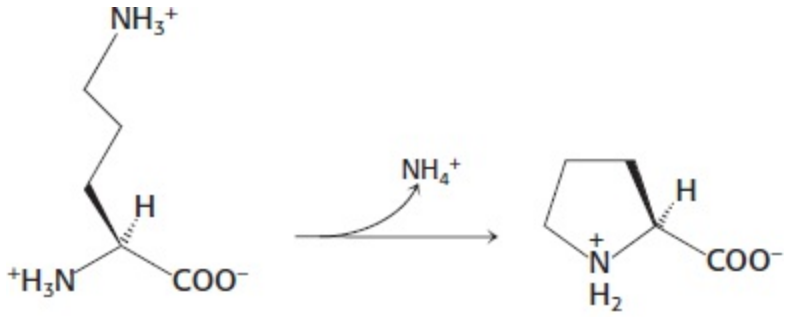
15. *Cisteína e cistina.* A maioria das proteínas citoplasmáticas carece de pontes de dissulfeto, enquanto as proteínas extracelulares habitualmente contêm essas pontes. Por quê?

16. *Através do espelho.* Suponha que a aspartato aminotransferase tenha sido quimicamente sintetizada apenas com o uso de D-aminoácidos. Que produtos você esperaria se a imagem especular dessa enzima fosse tratada com (a) L-aspartato e α-cetoglutarato; (b) D-aspartato e α-cetoglutarato?

17. *De um lado para outro.* A síntese de δ-aminolevulinato ocorre na matriz mitocondrial, enquanto a formação de porfobilinogênio ocorre no citoplasma. Proponha um motivo para a localização mitocondrial da primeira etapa na síntese do heme.

18. *Síntese direta.* Quais dos 20 aminoácidos podem ser sintetizados diretamente a partir de um intermediário metabólico comum por uma reação de transaminação?

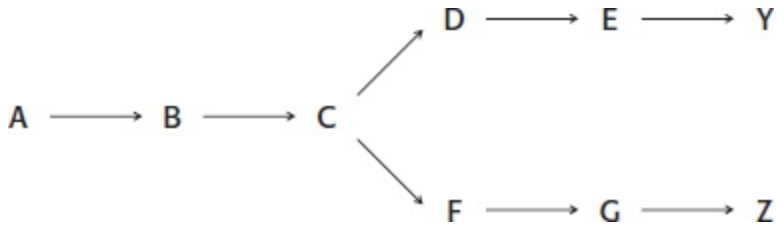
19. *Via alternativa para a prolina.* Certas espécies de bactérias possuem uma enzima, a ornitina ciclodesaminase, que tem a capacidade de catalisar a conversão da L-ornitina em L-prolina em um único ciclo catalítico.



Ornitina **Prolina**

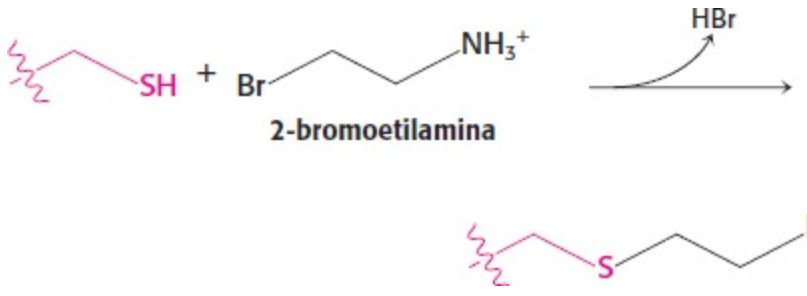
A enzima *lisina* ciclodesaminase também foi identificada. Sugira o produto da reação catalisada pela lisina ciclodesaminase.

20. *Linhas de comunicação.* No exemplo que se segue de uma via ramificada, proponha um esquema de inibição por retroalimentação que resultaria na produção de quantidades iguais de Y e Z.



21. *Inibição por retroalimentação cumulativa.* Considere a via ramificada na Questão 20. A primeira etapa comum (A → B) é inibida, em parte, por ambos os produtos finais, atuando cada um independentemente do outro. Suponha que um alto nível de Y isoladamente diminua a velocidade da etapa A → B de 100 para 60 s^{-1}, e que um alto nível de Z isoladamente diminua a velocidade de 100 para 40 s^{-1}. Qual seria a velocidade na presença de altos níveis de Y e Z?

22. *Atividade recuperada.* Os grupos sulfidrila livres podem ser alquilados com 2-bromoetilamina ao tioéter correspondente.



Pesquisadores prepararam uma forma mutante da aspartato aminotransferase, em que a lisina 258 foi

substituída por cisteína (Lys258Cys). Essa proteína mutante não tem nenhuma atividade catalítica observável. Entretanto, o tratamento de Lys258Cys com 2-bromoetilamina produziu uma proteína com cerca de 7% de atividade em comparação com a enzima de tipo selvagem. Explique por que a alquilação recuperou parte da atividade enzimática.

Questões sobre mecanismo

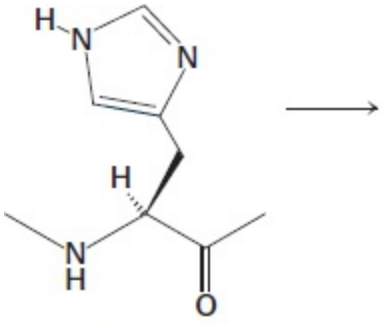
23. *Formação de etileno.* Proponha um mecanismo para a conversão da *S*-adenosilmetionina em 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) pela ACC sintase, uma enzima com PLP. Qual é o outro produto?

24. *Imagem especular da serina.* O tecido cerebral contém quantidades substanciais de D-serina, que é produzida a partir da L-serina pela serina racemase, uma enzima com PLP. Proponha um mecanismo para a interconversão entre L e D-serina. Qual é a constante de equilíbrio para a reação L-serina ⇋ D-serina?

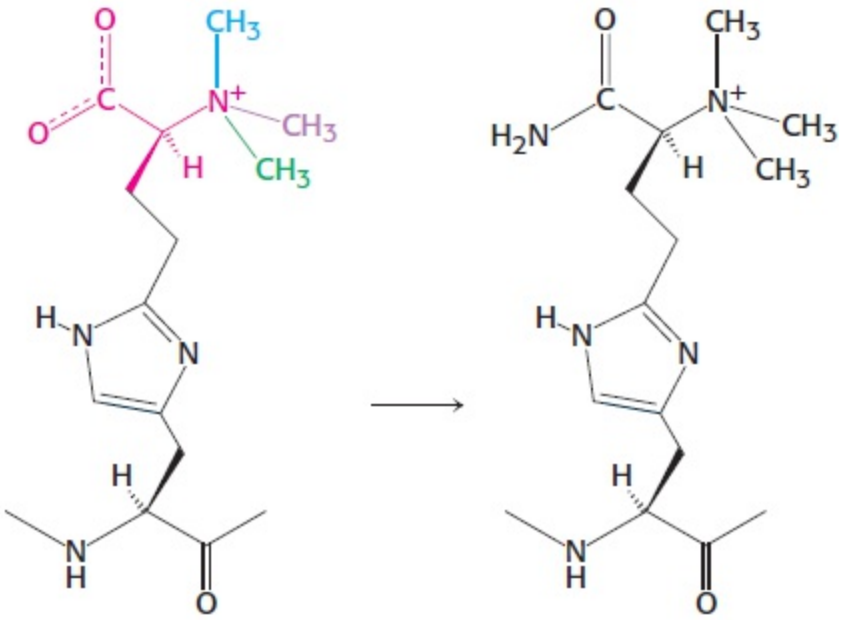
25. *Um aminoácido incomum.* O fator de alongamento 2 (eEF-2), uma proteína que atua na tradução, contém um resíduo de histidina que é modificado na pós-tradução em várias etapas, dando origem a uma cadeia lateral complexa conhecida como diftamida. Um intermediário ao longo dessa via é designado como diftina.

(a) Experimentos de marcação indicam que o intermediário diftina é formado pela modificação da histidina com quatro moléculas de *S*-adenosilmetionina (indicada pelas quatro cores na p. 740). Proponha um mecanismo para a formação da diftina.

(b) A conversão final da diftina em diftamida é dependente de ATP. Proponha dois mecanismos possíveis para a etapa final de amidação.



Histidina



Diftina

Diftamida

Questões | Integração de capítulos

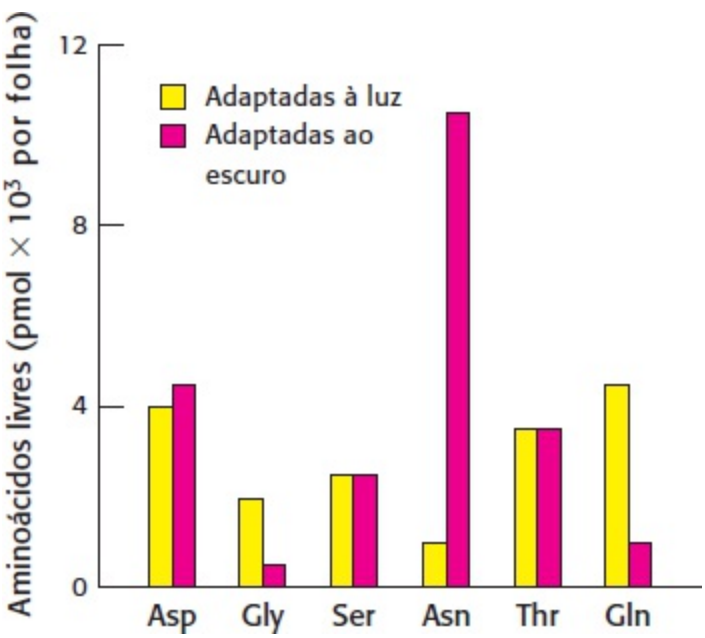
26. *Conexões*. Como a síntese aumentada de aspartato e glutamato poderia afetar a produção de energia de uma célula? Como a célula responderia a esse efeito?

27. *Proteção necessária.* Suponha que uma mutação em uma bactéria tenha resultado em diminuição da atividade da metionina adenosil transferase, a enzima responsável pela síntese de SAM a partir da metionina e do ATP. Sugira como essa atividade diminuída poderia afetar a estabilidade do DNA da bactéria mutante.

28. *Biossíntese do heme.* Shemin e colaboradores utilizaram experimentos com marcação do acetato para concluir que a succinil-CoA é um intermediário essencial na biossíntese do heme. Identifique os intermediários na conversão do acetato em succinil-CoA.

Questão de integração de capítulos e interpretação de dados

29. *Efeitos luminosos.* O gráfico a seguir mostra a concentração de vários aminoácidos livres em plantas adaptadas à luz e ao escuro.

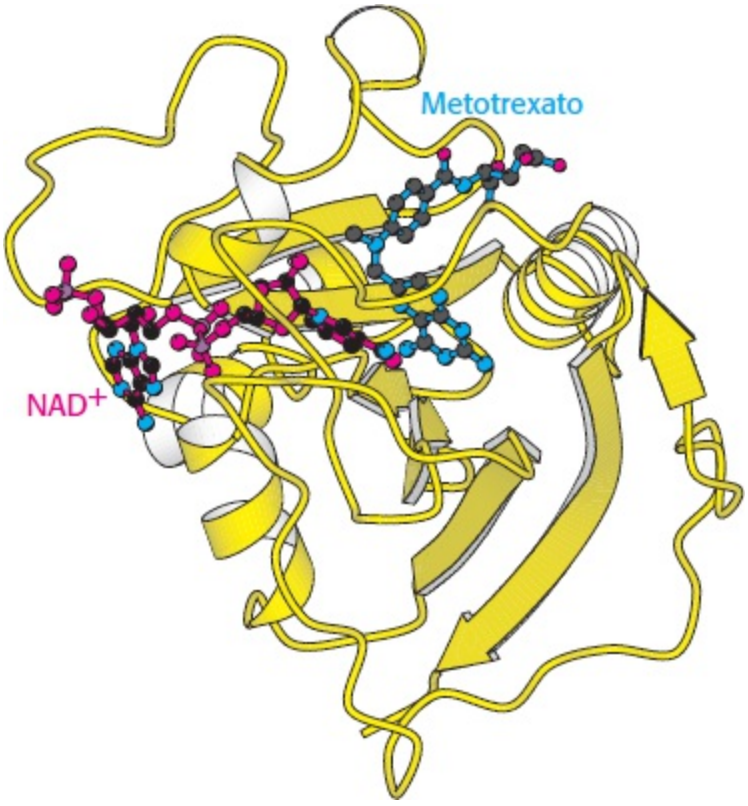


[De B. B. Buchanan, W. Gruissem, and R. L. Jones, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (American Society of Plant Physiology, 2000), Figura 8.3, p.363.]

(a) Dentre os aminoácidos mostrados, quais são os mais afetados pela adaptação à luz e ao escuro?

(b) Forneça uma explicação bioquímica plausível para a diferença observada.

(c) O aspargo branco, uma iguaria culinária, resulta do crescimento do aspargo no escuro. Qual substância química, que você acredita, poderia acentuar o sabor do aspargo branco?



Os nucleotídios são necessários para o crescimento e a replicação das células. A di-hidrofolato redutase (à direita) é uma enzima essencial para a síntese de um nucleotídio. O crescimento das células na presença de metotrexato, um inibidor da

redutase, é responsável pelo número crescente de cópias do gene da redutase. As regiões amarelas brilhantes visíveis em três dos cromossomos na micrografia de fluorescência (à esquerda), que foram cultivados na presença de metotrexato, contêm centenas de cópias do gene da redutase. [Imagem à esquerda, cortesia da Dra. Barbara Trask e da Dra. Joyce Hamlin.]

SUMÁRIO

25.1 O anel pirimidínico é montado *de novo* ou recuperado por vias de recuperação

25.2 As bases purínicas podem ser sintetizadas *de novo* ou recicladas por vias de recuperação

25.3 Os desoxirribonucleotídios são sintetizados pela redução de ribonucleotídios por meio de um mecanismo de formação de radicais livres

25.4 As etapas essenciais na biossíntese de nucleotídios são reguladas por inibição por retroalimentação

25.5 Os distúrbios no metabolismo de nucleotídios podem causar condições patológicas

Os nucleotídios são biomoléculas essenciais, necessárias para uma variedade de processos vitais. Em primeiro lugar, os nucleotídios são os *precursores ativados dos ácidos nucleicos*, necessários para a replicação do genoma e para a transcrição da informação genética em RNA. Em segundo lugar, um nucleotídio de adenina, o ATP, constitui a *"moeda corrente" universal de energia*. Um nucleotídio de guanina, o GTP, também atua como fonte de energia para um grupo mais seleto de processos biológicos. Em terceiro lugar, os derivados de nucleotídios, como a UDP-glicose, *participam em processos de biossíntese*, como a formação de glicogênio. Em quarto lugar, os nucleotídios são *componentes essenciais de vias de transdução de sinais*. Os nucleotídios cíclicos, como o AMP cíclico e o GMP cíclico, são segundos mensageiros que transmitem sinais dentro da célula, bem como entre células. Além disso, o ATP atua como doador de grupos fosforila transferidos por proteína quinases em uma variedade de vias de sinalização, e, em alguns casos, o ATP é secretado como molécula de sinalização.

Neste capítulo, continuaremos a nossa discussão iniciada no Capítulo 24 sobre a incorporação de nitrogênio em aminoácidos a partir de fontes inorgânicas, como o gás nitrogênio. Os aminoácidos glicina e aspartato constituem o arcabouço sobre os quais são montados os sistemas de anéis presentes nos nucleotídios. Além disso, o aspartato e a cadeia lateral da glutamina atuam como fontes de grupos NH_2 na formação de nucleotídios.

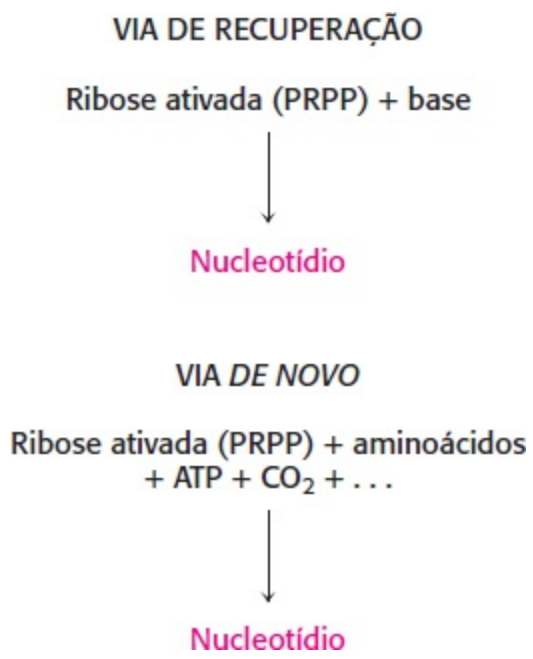


Figura 25.1 Vias de recuperação e *de novo*. Em uma via de recuperação, uma base é novamente ligada a uma ribose, ativada na forma de 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP). Na síntese *de novo*, a própria base é sintetizada a partir de materiais iniciais mais simples, incluindo aminoácidos. A hidrólise do ATP é necessária para a síntese *de novo*.

Tabela 25.1 Nomenclatura das bases, nucleosídios e nucleotídios.

RNA		
Base	Ribonucleosídio	Ribonucleotídio (5′-monofosfato)
Adenina (A)	Adenosina	Adenilato (AMP)
Guanina (G)	Guanosina	Guanilato (GMP)
Uracila (U)	Uridina	Uridilato (UMP)
Citosina (C)	Citidina	Citidilato (CMP)
DNA		
Base	Desoxirribonucleosídio	Desoxirribonucleotídio (5′-monofosfato)
Adenina (A)	Desoaxiadenosina	Desoxiadenilato (dAMP)
Guanina (G)	Desoxiguanosina	Desoxiguanilato (dGMP)
Timina (T)	Timidina	Timidilato (TMP)
Citosina (C)	Desoxicitidina	Desoxicitidilato (dCMP)

As vias de biossíntese de nucleotídios são de suma importância como pontos de intervenção para agentes terapêuticos. Muitos dos fármacos mais amplamente usados no tratamento do câncer bloqueiam etapas na biossíntese do nucleotídios, paricularmente etapas na síntese dos precursores de DNA.

Os nucleotídios podem ser sintetizados *de novo* ou por vias de recuperação

As vias de biossíntese de nucleotídios são divididas em duas classes: as vias *de novo* e as vias de *recuperação* (Figura 25.1). Nas vias *de novo* (começando de zero), ocorre montagem das bases nucleotídicas a partir de compostos mais simples. Inicialmente, a estrutura de uma base *pirimidínica* é montada e, em seguida, ligada à ribose. Em contrapartida, a estrutura de uma base *purínica* é sintetizada, peça por peça, diretamente sobre a estrutura da base de ribose. Essas vias apresentam, cada uma delas, um pequeno número de reações elementares, que são repetidas com variações, produzindo diferentes nucleotídios, como se esperaria de vias que surgiram bem no início da evolução. Nas vias de recuperação, bases pré-formadas são recuperadas e novamente ligadas a uma unidade de ribose.

As vias *de novo* levam à síntese de *ribo*nucleotídios. Entretanto, o DNA é formado a partir de *desoxirribo*nucleotídios. Considerando que o RNA precedeu o DNA no curso da evolução, todos os desoxirribonucleotídios são sintetizados a partir dos ribonucleotídios correspondentes. O açúcar desoxirribose é produzido pela redução da ribose em um nucleotídio totalmente formado. Além disso, o grupo metila que distingue a timina no DNA da uracila no RNA é acrescentado na última etapa da via.

A nomenclatura dos nucleotídios e suas unidades constituintes já foram apresentadas no Capítulo 4. Convém lembrar que um *nucleosídio* é constituído de uma base purina ou pirimidina ligada a um açúcar, enquanto um *nucleotídio* é um éster fosfato de um nucleosídio. Os nomes das principais bases do RNA e do DNA e seus nucleosídios e nucleotídios derivados são apresentados na Tabela 25.1.

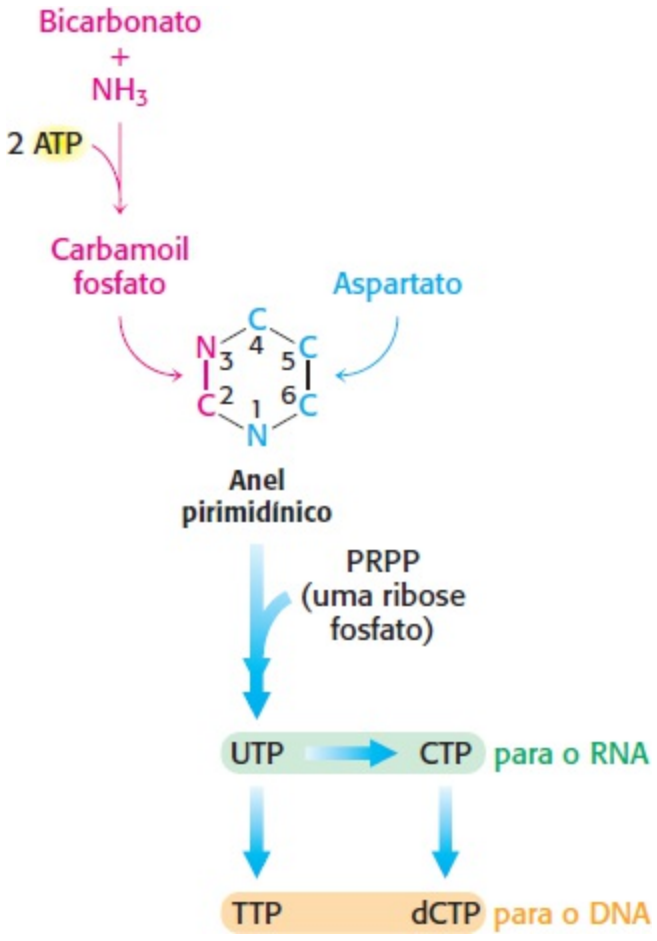


Figura 25.2 Via *de novo* para a síntese de nucleotídios pirimidínico. Os átomos de C-2 e N-3 no anel pirimidínico provêm do carbamoil fosfato, enquanto os outros átomos do anel se originam do aspartato.

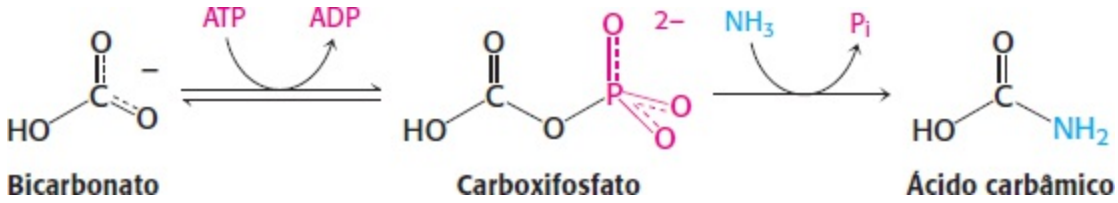
25.1 O anel pirimidínico é montado *de novo* ou recuperado por vias de recuperação

Na síntese *de novo* de pirimidinas, o anel é sintetizado em primeiro lugar e, em seguida, ligado a uma ribose fosfato, formando um *nucleotídio pirimidínico* (Figura 25.2). Os anéis pirimidínicos são montados a partir de bicarbonato, aspartato e amônia. Embora uma molécula de amônia já presente em solução possa ser usada, ela é habitualmente produzida pela hidrólise da cadeia lateral da glutamina.

O bicarbonato e outros compostos de carbono oxigenados são ativados por fosforilação

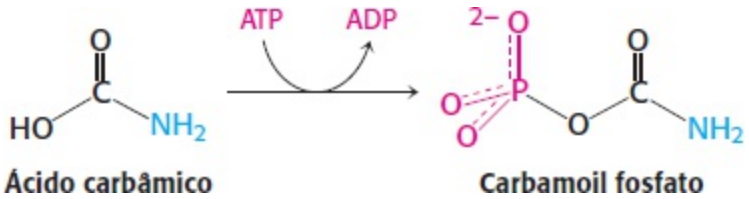
A primeira etapa na biossíntese *de novo* das pirimidinas é a síntese de *carbamoil fosfato* a partir de bicarbonato e amônia, em um processo de múltiplas etapas, que exige a clivagem de duas moléculas de ATP. Essa reação é catalisada pela *carbamoil fosfato sintetase* (CPS; Seção 23.4). A análise da estrutura da CPS revela dois domínios homólogos, cada um dos quais catalisa uma etapa dependente de ATP (Figura 25.3).

Na primeira etapa, o bicarbonato é fosforilado pelo ATP, formando carboxifosfato e ADP. Em seguida, a amônia reage com carboxifosfato formando ácido carbâmico e fosfato inorgânico.



O sítio ativo dessa reação reside em um domínio constituído pelo terço aminoterminal da CPS. Esse domínio forma uma estrutura, denominada enovelamento do tipo *ATP grasp*, que circunda o ATP e o mantém em uma orientação adequada para ataque nucleofílico no grupo fosforila γ. As proteínas que contêm domínios de *ATP grasp* catalisam a formação de ligações carbono-nitrogênio por meio de intermediários de acil-fosfatos. Os domínios *ATP grasp* são amplamente usadas na biossíntese de nucleotídios.

Na segunda etapa catalisada pela carbamoil fosfato sintetase, o ácido carbâmico é fosforilado por outra molécula de ATP, formando carbamoil fosfato.



Essa reação ocorre em um segundo domínio de *ATP grasp* dentro da enzima. Os sítios ativos que levam à formação de ácido carbâmico e carbamoil fosfato são muito semelhantes, revelando que essa enzima evoluiu por um evento de duplicação gênica. Com efeito, a duplicação gênica que codifica um domínio de *ATP grasp*, seguida de especialização, foi central para a evolução dos processos de biossíntese de nucleotídios (p. 747).

A cadeia lateral da glutamina pode ser hidrolisada para produzir amônia

A glutamina constitui a principal fonte de amônia para a carbamoil fosfato sintetase. Neste caso, um segundo componente polipeptídico da enzima hidrolisa a glutamina, formando amônia e glutamato. O sítio ativo do componente de hidrólise da glutamina contém uma díade catalítica, constituída de um resíduo de cisteína e de histidina. Essa díade catalítica, que lembra o sítio ativo das cisteínas proteases (ver Figura 9.16), é conservada em uma família de amidotransferases, incluindo a CTP sintetase e a GMP sintetase.

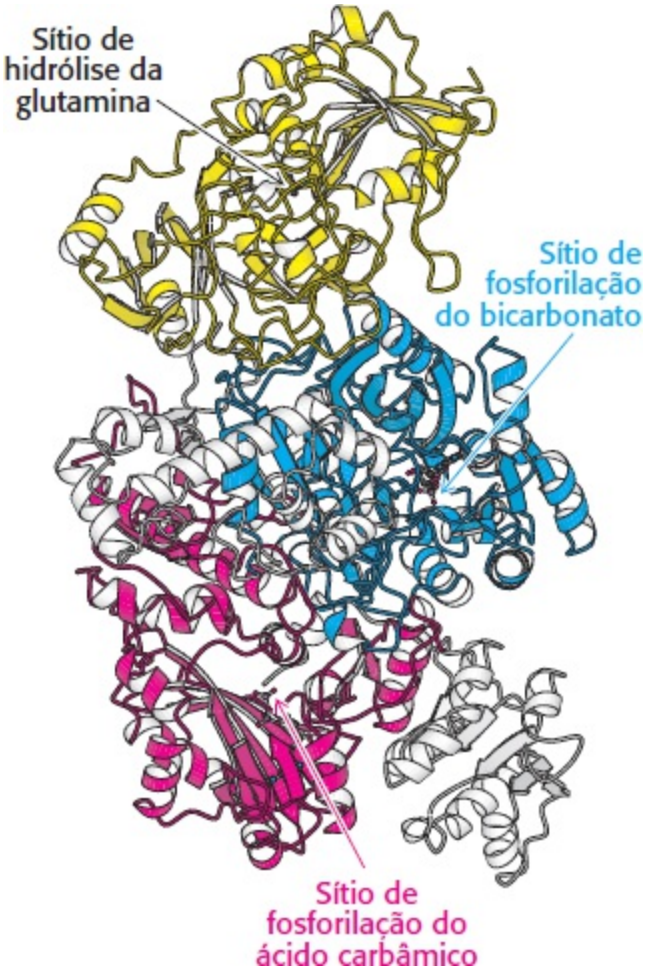


Figura 25.3 Estrutura da carbamoil fosfato sintetase. *Observe* que a enzima contém sítios para três reações. Essa enzima é constituída de duas cadeias. A cadeia menor (amarela) contém um sítio para a hidrólise de glutamina, gerando amônia. A cadeia maior inclui dois domínios de *ATP grasp* (azul e vermelho). Em um desses domínios de *ATP grasp* (azul), o bicarbonato é fosforilado a carboxifosfato, que então reage com amônia, produzindo ácido carbâmico. No outro domínio de *ATP grasp*, o ácido carbâmico é fosforilado, produzindo carbamoil fosfato. [Desenhada a partir de 1JDB.pdb.]

Os intermediários podem se mover entre os sítios ativos por canalização

A carbamoil fosfato sintetase contém três sítios ativos diferentes (Figura 25.3), separados uns dos outros por uma distância total de 80 Å. Os intermediários produzidos em um sítio movem-se para o seguinte, sem sair da enzima. Esses intermediários movem-se dentro da enzima por meio de canalização do substrato, à semelhança do processo descrito para a triptofano sintetase (Figura 25.4; também Figura 24.17). A amônia produzida no sítio ativo de hidrólise da glutamina percorre uma distância de 45 Å através de um canal no interior da enzima para alcançar o sítio onde foi gerado o carboxifosfato. O ácido carbâmico produzido nesse sítio difunde-se por mais uma distância de 35 Å pela extensão do canal, alcançando o sítio onde ocorre a produção de carbamoil fosfato. Essa canalização desempenha duas funções: (1) os intermediários produzidos em um sítio ativo são

capturados, sem qualquer perda por difusão, e (2) os intermediários lábeis, como o carboxifosfato e o ácido carbâmico (que se decompõem em menos de 1 s em pH 7), são protegidos da hidrólise. Veremos mais exemplos de canalização de substratos posteriormente neste capítulo.

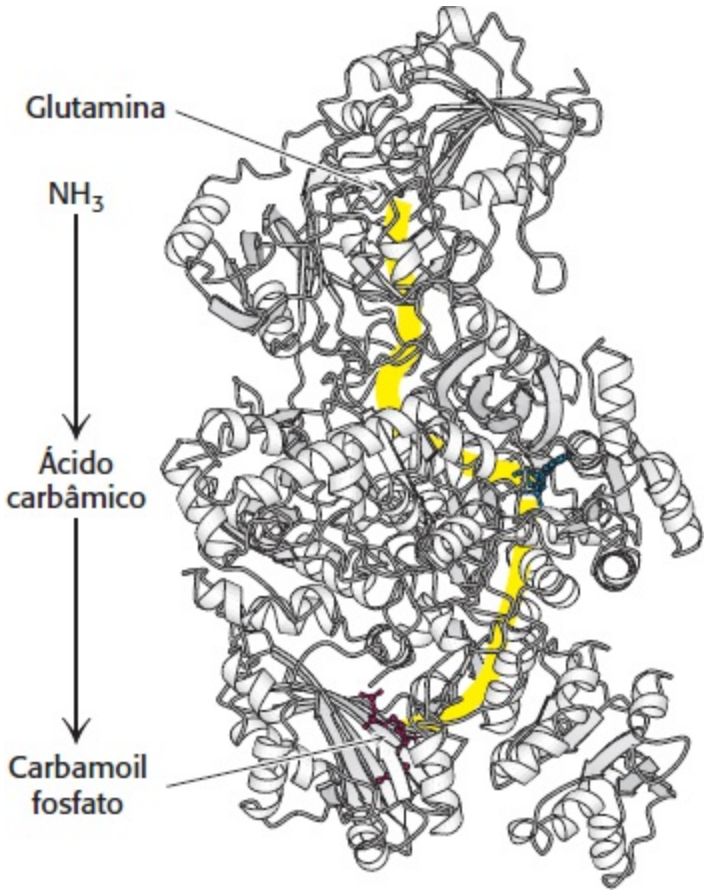
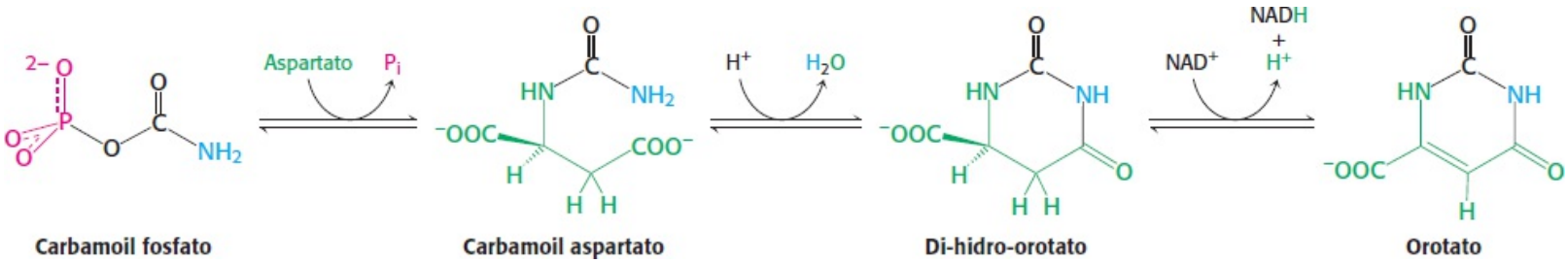


Figura 25.4 Canalização do substrato. Os três sítios ativos da carbamoil fosfato sintetase estão ligados por um canal (amarelo) através do qual passam os intermediários. A glutamina entra em um sítio ativo, e o carbamoil fosfato, que inclui o átomo de nitrogênio da cadeia lateral de glutamina, deixa o outro a uma distância de 80 Å. [Desenhada a partir de 1JDB.pdb.]

O orotato adquire um anel de ribose do PRPP, formando um nucleotídio de pirimidina, e é convertido em uridilato

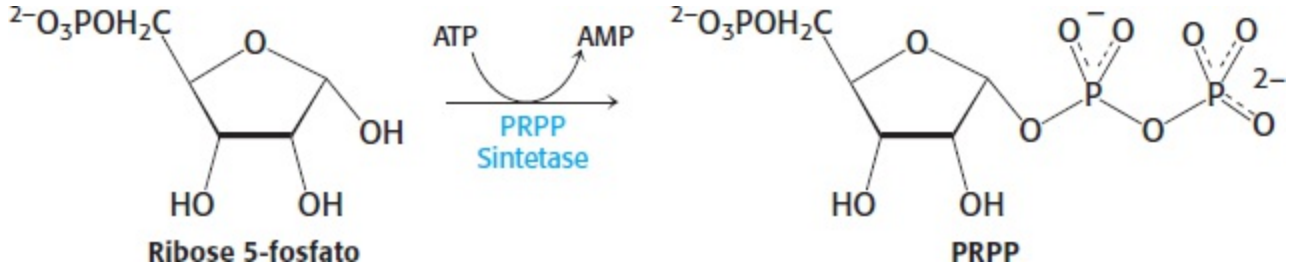
O carbamoil fosfato reage com aspartato, formando carbamoil aspartato, em uma reação catalisada pela aspartato *transcarbamoilase* (Seção 10.1). Em seguida, o carbamoil aspartato cicliza, formando di-hidro-orotato, que é então oxidado pelo NAD^+, formando orotato.



Nos mamíferos, as enzimas que formam o orotato fazem parte de uma única cadeia polipeptídica grande, denominada CAD, uma abreviatura de *c*arbamoil fosfato sintetase, *a*spartato transcarbamoilase e *d*i-hidro-orotase.

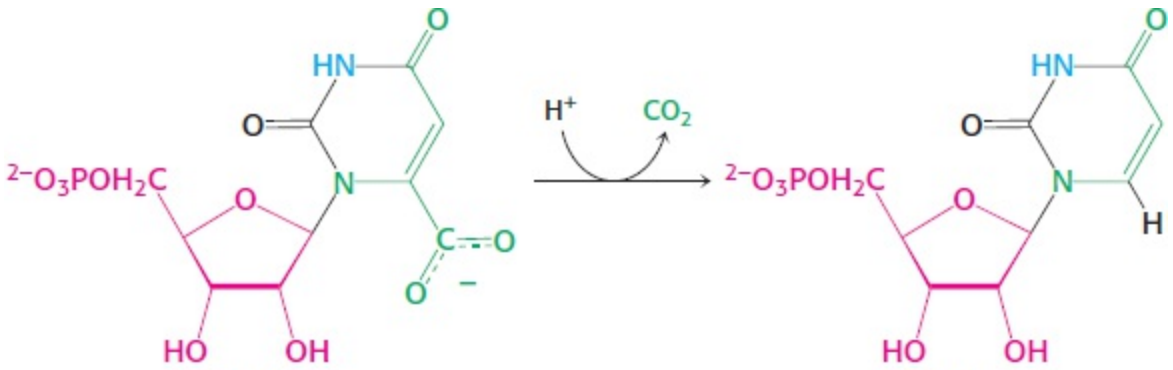
Nesse estágio, o orotato acopla-se à ribose, na forma de *5-fosforribosil-1-pirofosfato* (PRPP),

uma forma de ribose ativada para aceitar bases nucleotídicas. A *5-fosforribosil-1-pirofosfato sintetase* sintetiza PRPP pela adição de um pirofosfato do ATP à ribose 5-fosfato, que é formada pela via das pentoses fosfato.



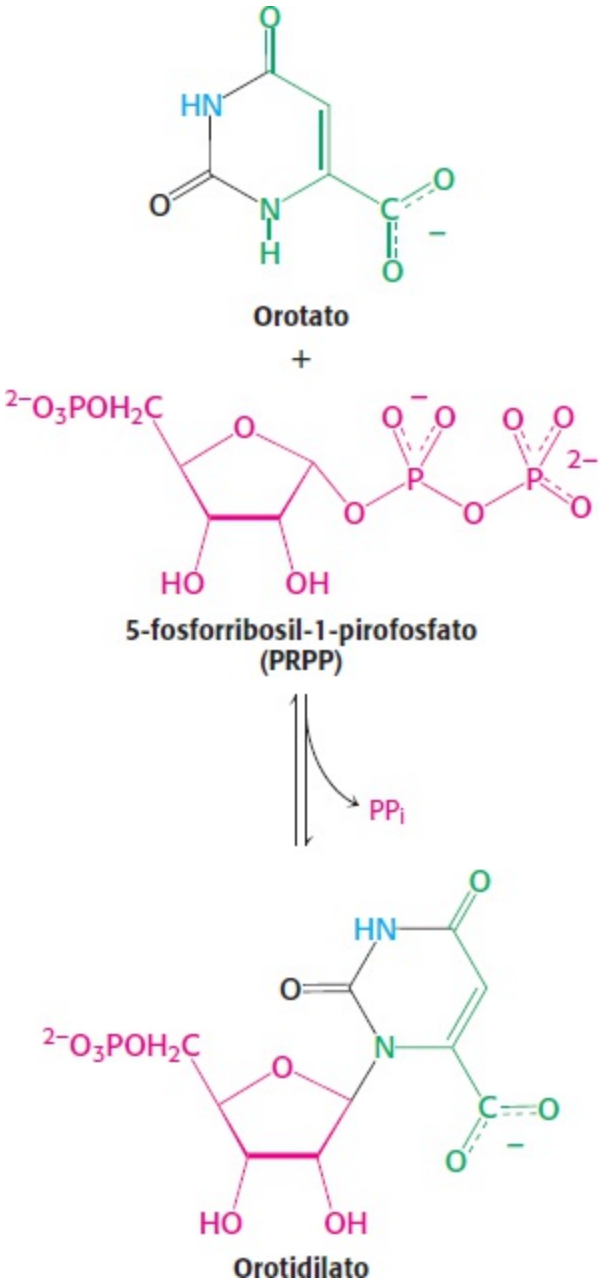
Ribose 5-fosfato PRPP

O orotato reage com o PRPP, formando *orotidilato*, um nucleotídio de pirimidina. Essa reação é impulsionada pela hidrolise do pirofosfato. A enzima que catalisa essa adição, a *pirimidina fosforribosil transferase*, é homóloga a várias outras fosforribosil transferases, que acrescentam diferentes grupos ao PRPP, formando os outros nucleotídios. A seguir, o orotidilato é descarboxilado para formar *uridilato* (UMP), um importante nucleotídio pirimidínico, que é um precursor do RNA. Essa reação é catalisada pela *orotidilato descarboxilase*.



Orotidilato Uridilato

A orotidilato descarboxilase é uma das enzimas mais proficientes conhecidas. Em sua ausência, a descarboxilação é extremamente lenta, e calculase que ocorra uma vez a cada 78 milhões de anos. Na presença da enzima, ela ocorre aproximadamente uma vez por segundo, representando um aumento de velocidade de 10^{17} vezes.



Os mono, di e trifosfatos de nucleotídios são interconversíveis

Como é formado o outro importante ribonucleotídio de pirimidina, a citidina? Ele é sintetizado a partir da base uracila do UMP, porém essa síntese só pode ocorrer após a conversão do UMP em UTP. Convém lembrar que os difosfatos e os trifosfatos constituem as formas ativas dos nucleotídios na biossíntese e na conversão da energia. Os monofosfatos de nucleosídios são convertidos em trifosfatos de nucleosídios em estágios. Em primeiro lugar, os *monofosfatos de nucleosídios* são convertidos em difosfatos por nucleosídio monofosfato quinases específicas, que utilizam ATP como doador de grupo fosforila. Por exemplo, o UMP é fosforilado a UDP pela *UMP quinase*.

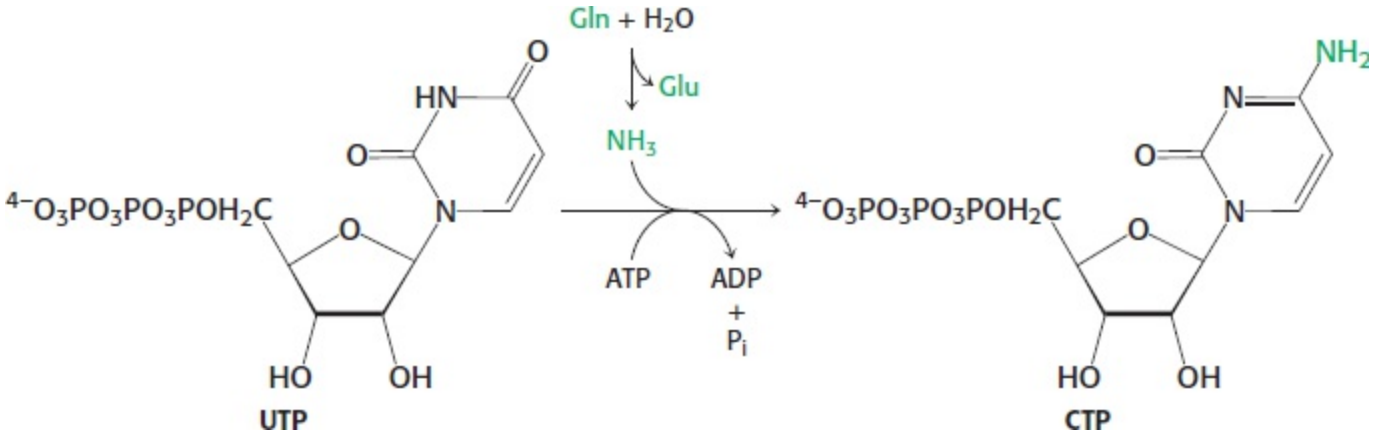
$$\text{UMP} + \text{ATP} \leftrightharpoons \text{UDP} + \text{ADP}$$

Os difosfatos e os trifosfatos de nucleosídios são interconvertidos pela *nucleosídio difosfato quinase*, uma enzima que apresenta uma ampla especificidade, diferentemente das monofosfato quinases. X e Y representam qualquer um de vários ribonucleosídios e até mesmo desoxirribonucleosídios:

$$\text{XDP} + \text{YTP} \leftrightharpoons \text{XTP} + \text{YDP}$$

A CTP é formada por aminação da UTP

Uma vez formada, a uridina trifosfato pode ser transformada em *citidina trifosfato* pela substituição de um grupo carbonila por um grupo amino, em uma reação catalisada pela *citidina trifosfato sintetase*.



À semelhança da síntese de carbamoil fosfato, essa reação necessita de ATP e utiliza a glutamina como fonte de grupo amino. A reação ocorre por um mecanismo análogo, em que o átomo O-4 é fosforilado, formando um intermediário reativo, e, em seguida, o fosfato é deslocado pela amônia liberada da glutamina por hidrólise. A CTP pode ser então usada por numerosos processos bioquímicos, incluindo a síntese de lipídios e de RNA.

As vias de recuperação reciclam bases de pirimidinas

As bases pirimidínicas podem ser recuperadas a partir dos produtos de degradação do DNA e do RNA pelo uso de *vias de recuperação*. Nessas vias, uma base pré-formada é reincorporada em um nucleotídio. Consideraremos a recuperação da base pirimidínica, timina. A timina é encontrada no DNA e forma um par de bases com a adenina na dupla-hélice de DNA. A timina liberada do DNA degradado é recuperada em duas etapas. Na primeira, a timina é convertida no nucleosídio timidina pela *timidina fosforilase*.

$$\text{Timina} + \text{desoxirribose-1-fosfato} \leftrightharpoons \text{timidina} + P_i$$

A seguir, a timidina é convertida em um nucleotídio pela timidina quinase.

$$\text{Timidina} + \text{ATP} \leftrightharpoons \text{TMP} + \text{ADP}$$

A atividade da timidina quinase flutua de acordo com o ciclo celular, exibindo uma atividade máxima durante a fase S, quando a síntese de DNA está ocorrendo. A timidina quinase viral difere da enzima dos mamíferos e, portanto, fornece um alvo terapêutico. Por exemplo, as infecções por herpes simples são tratadas com aciclovir, que é convertido pela timidina quinase viral em um inibidor suicida que interrompe a síntese de DNA. Como veremos adiante, a timidina quinase também desempenha um papel na síntese *de novo* do timidilato.

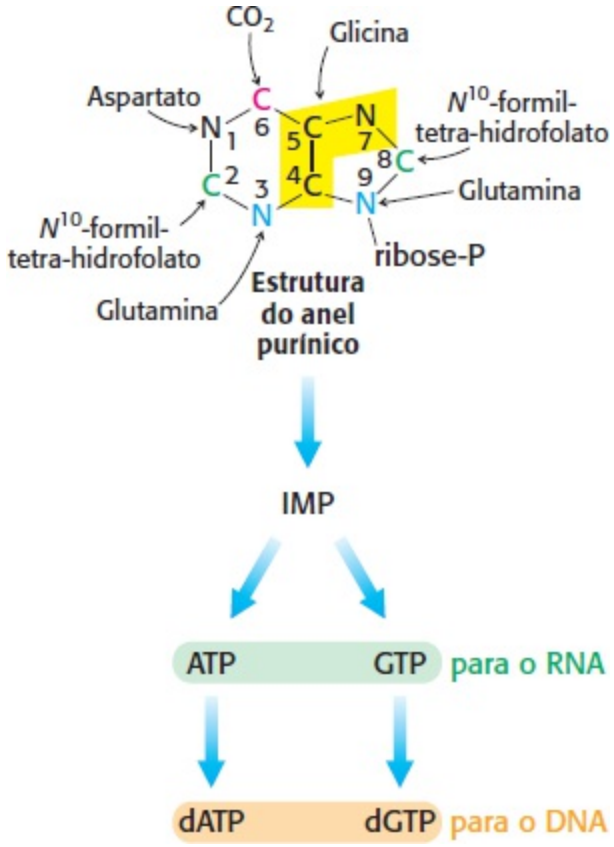


Figura 25.5 Via *de novo* para a síntese de nucleotídios purínicos. São indicadas as origens dos átomos do anel purínico.

25.2 As bases purínicas podem ser sintetizadas *de novo* ou recicladas por vias de recuperação

À semelhança dos nucleotídios pirimidínicos, os *nucleotídios purínicos* podem ser sintetizados *de novo* ou por uma via de recuperação. Quando sintetizados *de novo*, a síntese de purinas começa com materiais iniciais simples, como aminoácidos e bicarbonato (Figura 25.5). Diferentemente das bases de pirimidinas, as bases purínicas são montadas já ligadas ao anel de ribose. De modo alternativo, as bases purínicas, liberadas pela degradação hidrolítica de ácidos nucleicos e nucleotídios, podem ser recuperadas e recicladas. As vias de recuperação das purinas são particularmente notáveis pela energia preservada e pelos efeitos marcantes de sua ausência (p. 758).

O sistema do anel purínico é montado sobre a ribose fosfato

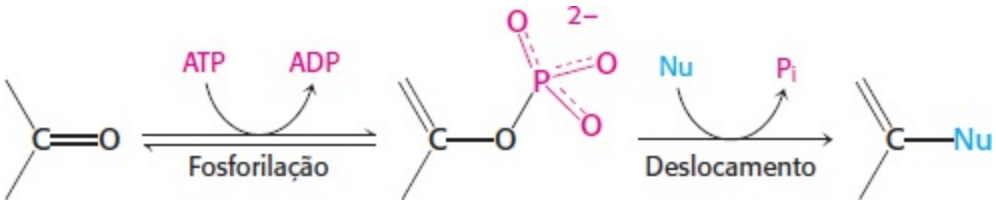
A biossíntese *de novo* das purinas, à semelhança da biossíntese de pirimidinas, necessita de PRPP; entretanto, para as purinas, o PRPP fornece o alicerce sobre a qual as bases são construídas passo a passo. A etapa comprometida inicial é o deslocamento do pirofosfato pela amônia, e não por uma base pré-montada, produzindo *5-fosforribosil-1-amina*, estando a amina na configuração β.

Essa reação é catalisada pela *glutamina fosforribosil amidotransferase*. Esta enzima é constituída de dois domínios: o primeiro é homologo às fosforribosil transferases nas vias de recuperação das purinas (p. 750), enquanto o segundo produz amônia a partir da glutamina por hidrólise. Entretanto, esse domínio de hidrólise de glutamina é distinto daquele que exerce a mesma função na carbamoil fosfato sintetase. Na glutamina fosforribosil amidotransferase, a hidrólise da glutamina é facilitada por um resíduo de cisteína localizado na extremidade aminoterminal. Para evitar o desperdício com a

hidrólise de qualquer um dos substratos, a amidotransferase só assume a configuração ativa quando se liga tanto ao PRPP quanto à glutamina. Como no caso da carbamoil fosfato sintetase, a amônia produzida no sítio ativo de hidrólise da glutamina passa por um canal para alcançar o PRPP sem ser liberada na solução.

O anel de purina é montado por etapas sucessivas de ativação por fosforilação seguida de deslocamento

São necessárias nove etapas adicionais para a montagem do anel de purina. É importante observar que as primeiras seis etapas são reações análogas. A maioria dessas etapas é catalisada por enzimas com domínios de *ATP grasp*, que são homólogos aos da carbamoil fosfato sintetase. *Cada etapa consiste na ativação de um átomo de oxigênio ligado a carbono (tipicamente, um átomo de oxigênio carbonílico) por fosforilação, seguida de deslocamento do grupo fosforila pela amônia ou de um grupo amina que atua como nucleófilo* (Nu).



A biossíntese *de novo* das purinas ocorre como mostra a Figura 25.6. A Tabela 25.2 fornece uma lista das enzimas que catalisam cada etapa da reação.

1. O grupo carboxilato de um resíduo de glicina é ativado por fosforilação e, em seguida, acoplado ao grupo amino da fosforribosilamina. Forma-se uma nova ligação amida, e o grupo amino da glicina fica livre para atuar como nucleófilo na etapa seguinte.

2. O formato é ativado e, em seguida, acrescentado a esse grupo amino, formando formilglicinamida ribonucleotídio.

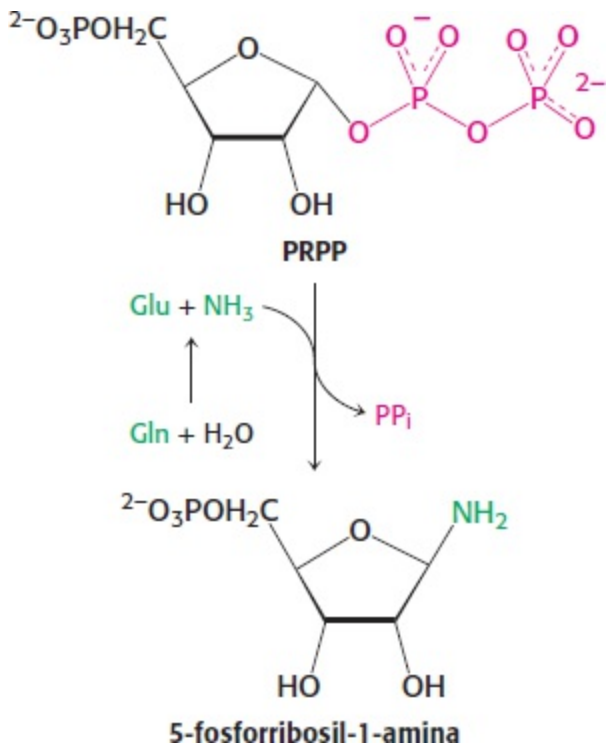


Tabela 25.2 Enzimas da síntese *de novo* das purinas.

Etapa	Enzima
1	Glicinamida ribonucleotídio (GAR) sintetase
2	GAR transformilase
3	Formilglicinamidina sintase
4	Aminoimidazol ribonucleotídio sintetase
5	Carboxiaminoimidazol ribonucleotídio sintase
6	Succinilaminoimidazol carboxamida ribonucleotídio sintetase
7	Adenilossuccinato liase
8	Aminoimidazol carboxamida ribonucleotídio transformilase
9	Inosina monofosfato ciclo-hidrolase

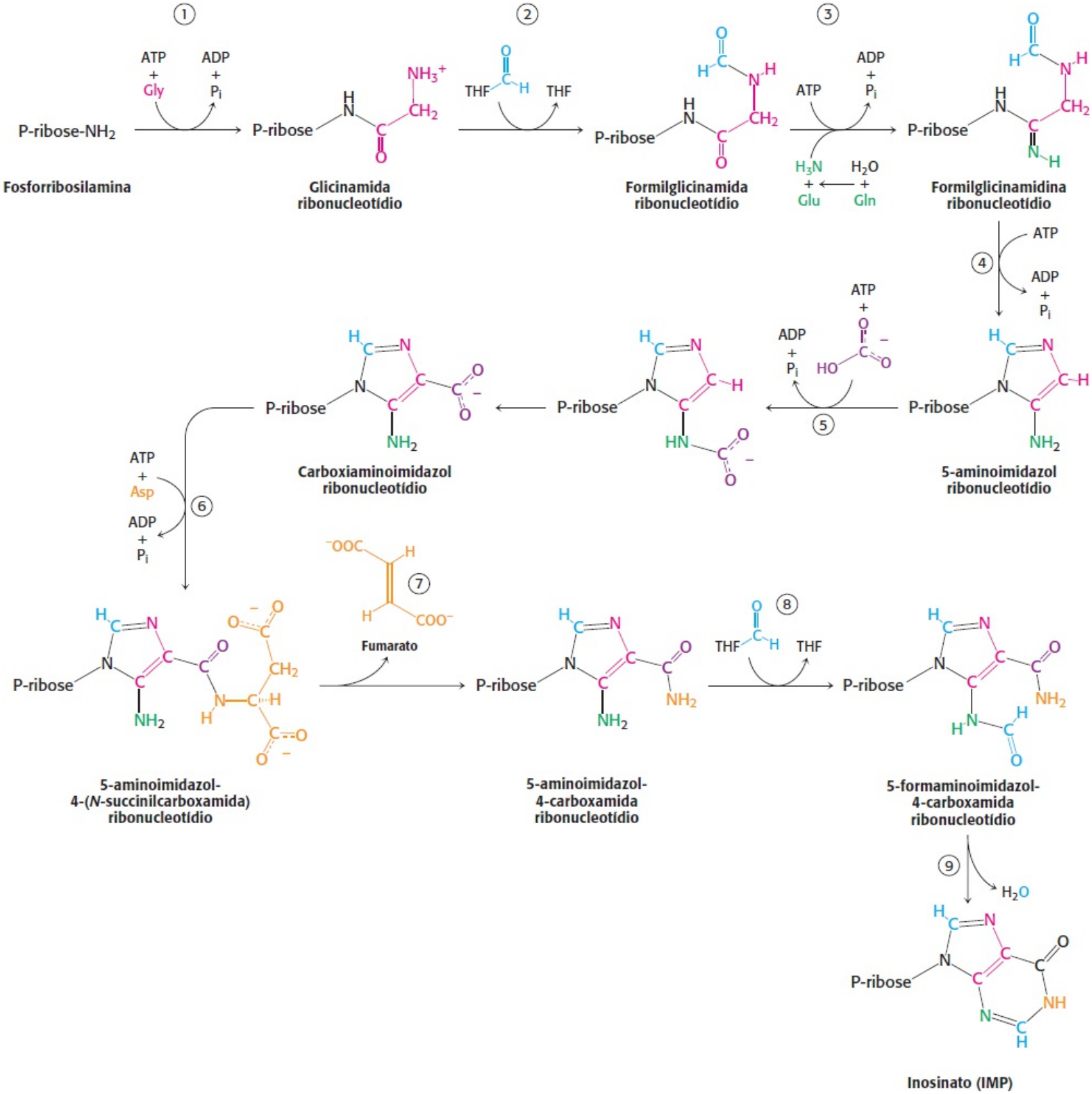


Figura 25.6 Biossíntese *de novo* das purinas. **1**. A glicina é acoplada ao grupo amino da fosforribosilamina. **2.** O N^{10}-formiltetra-hidrofolato (THF) transfere um grupo formila para o grupo amino do resíduo de glicina. **3.** O grupo amida interno é fosforilado e convertido em uma amidina pela adição de amônia proveniente da glutamina. **4.** Uma reação de acoplamento intramolecular forma o anel imidazol de cinco membros. **5.** O bicarbonato é acrescentado inicialmente ao grupo amino exocíclico e, em seguida, a um átomo de carbono do anel imidazol. **6.** O imidazol carboxilato é fosforilado, e o fosfato é deslocado pelo grupo amino do aspartato. **7.** O fumarato é liberado. **8.** Um segundo grupo formila é doado do N^{10}-formiltetra-hidrofolato (THF). **9.** A ciclização completa a síntese de inosinato, um nucleotídio de purina.

3. O grupo carbonila interno é ativado por fosforilação e, em seguida, convertido por uma amidina pela adição de amônia derivada da glutamina.

4. O produto dessa reação, formilglicinamidina ribonucleotídio, cicliza para formar o anel imidazol de cinco membros encontrado nas purinas. Embora essa ciclização provavelmente seja favorável do ponto de vista termodinâmico, uma molécula de ATP é consumida para garantir a irreversibilidade. O padrão familiar é repetido: um grupo fosforila da molécula de ATP ativa o grupo carbonila e é deslocado pelo átomo de nitrogênio ligado à molécula de ribose. Por conseguinte, a ciclização é uma reação intramolecular, em que o nucleófilo e o átomo de carbono ativado pelo fosfato estão presentes na mesma molécula. Nos eucariotos superiores, as enzimas que catalisam as etapas 1,2 e 4 (Tabela 25.2) são componentes de uma única cadeia polipeptídica.

5. O bicarbonato é ativado por fosforilação e, em seguida, atacado pelo grupo amino exocíclico. O produto da reação na etapa 5 sofre rearranjo para transferir o grupo carboxilato ao anel imidazol. É interessante observar que os mamíferos não necessitam de ATP para essa etapa; aparentemente, o bicarbonato liga-se diretamente ao grupo amino exocíclico e, em seguida, é transferido para o anel imidazol.

6. O grupo carboxilato do imidazol é novamente fosforilado, e o grupo fosfato é deslocado pelo grupo amino do aspartato. Mais uma vez, nos eucariotos superiores, as enzimas que catalisam as etapas 5 e 6 (Tabela 25.2) compartilham uma única cadeia polipeptídica.

7. O fumarato, um intermediário no ciclo do ácido cítrico, é eliminado, deixando o átomo de nitrogênio do aspartato ligado ao anel imidazol. O uso de aspartato como doador de grupo amino e a liberação concomitante de fumarato lembra a conversão da citrulina em arginina no ciclo da ureia, e essas etapas são catalisadas por enzimas homólogas nas duas vias (Seção 23.4).

8. Um grupo formila do N^{10}-formil-tetra-hidrofolato é acrescentado a esse átomo do nitrogênio, formando um 5-formaminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídio final.

9. O 5-formaminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídio cicliza com a perda de água, formando o inosinato.

Muitos dos intermediários na via de biossíntese *de novo* das purinas sofrem rápida degradação em água. A sua instabilidade em água sugere que o produto de uma enzima precisa ser canalizado diretamente para a próxima enzima ao longo da via. Evidências recentes mostraram que as enzimas formam, de fato, complexos quando há necessidade de síntese de purinas.

O AMP e o GMP são formados a partir do IMP

Algumas etapas convertem o inosinato em AMP ou GMP (Figura 25.7). O *adenilato* é sintetizado a partir do inosinato pela substituição do átomo de oxigênio carbonila em C-6 por um grupo amino. Mais uma vez, a adição de aspartato, seguida da eliminação de fumarato, contribui para o grupo amino. O GTP, e não o ATP, é o doador de grupo fosforila na síntese do intermediário adenilossuccinato a partir do inosinato e aspartato. De acordo com a utilização de GTP, a enzima que promove essa conversão, a *adenilossuccinato sintase*, está estruturalmente relacionada com a família de proteínas G e não contém um domínio *ATP grasp*.

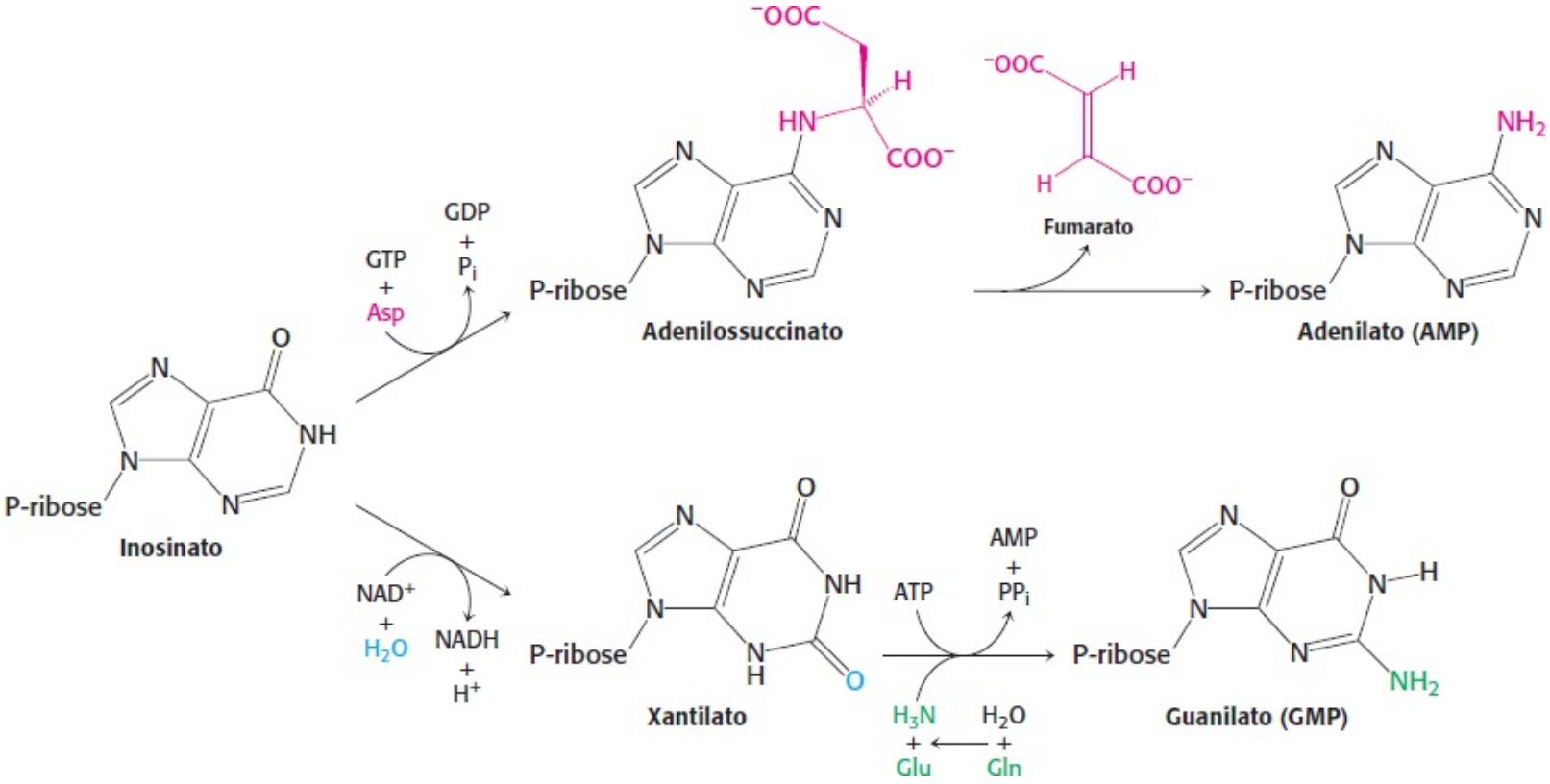


Figura 25.7 Produção de AMP e GMP. O inosinato é o precursor do AMP e do GMP. O AMP é formado pela adição de aspartato, seguida da liberação de fumarato. O GMP é produzido pela adição de água, desidrogenação pelo NAD+ e substituição do átomo de oxigênio carbonila por $–NH_2$ derivada da hidrólise da glutamina.

O *guanilato* é sintetizado pela oxidação do inosilato a xantilato (XMP), seguida da incorporação de um grupo amino em C-2. O NAD^+ é o aceptor de hidrogênio na oxidação do inosinato. O xantilato é ativado pela transferência de um grupo AMP (em lugar de um grupo fosforila) do ATP para o átomo de oxigênio do grupo carbonila recém-formado. A amônia, produzida pela hidrólise da glutamina, desloca então, o grupo AMP para formar guanilato, em uma reação catalisada pela *GMP sintetase*. Observe que a síntese de adenilato requer a presença de GTP, enquanto a síntese de guanilato necessita de ATP. Esse uso recíproco de nucleotídios pelas vias cria uma importante oportunidade de regulação (Seção 25.4).

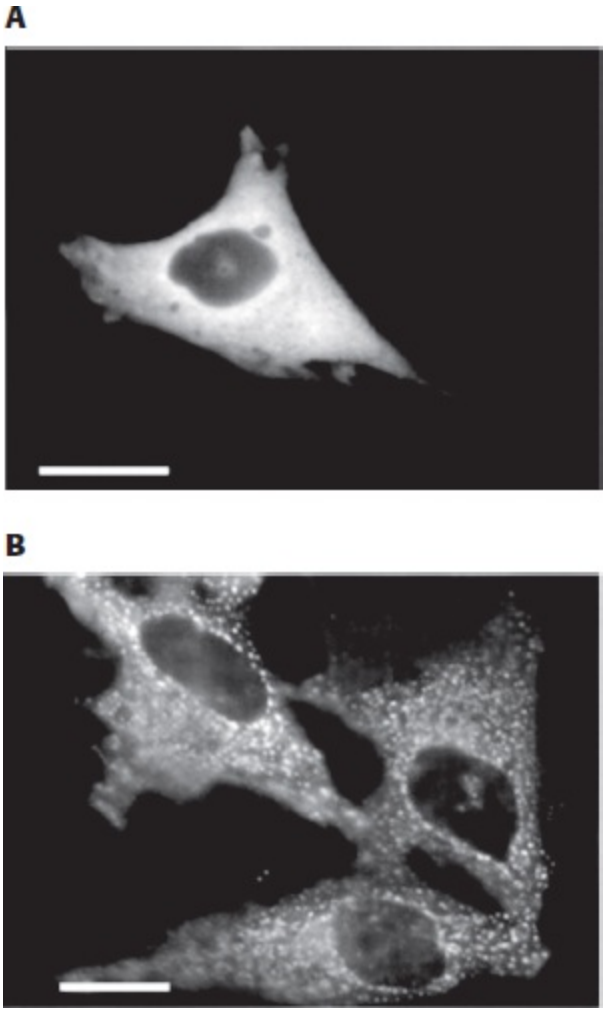


Figura 25.8 Formação de purinossomos. Uma construção gênica que codifica uma proteína de fusão, constituída de formilglicinamidina sintase e GFP foi transfectada e expressa em células Hela, uma linhagem celular humana. **A.** Na presença de purinas (ausência de síntese de purinas), a GFP foi observada como coloração difusa por todo o citoplasma. **B.** Quando as células foram transferidas para um meio de cultura desprovido de purina, houve formação de purinossomos, que aparecem como grânulos citoplasmáticos, e ocorreu a síntese de purinas. [An, S., Kumar, R., Sheets, E. D., and Benkovic, S. J. 2008. Science 320:103-106. Figure 2, C and D.]

As enzimas da via de síntese de purinas associam-se umas às outras *in vivo*

Os bioquímicos acreditam que as enzimas de muitas vias metabólicas, como a glicólise e o ciclo do ácido cítrico, estão fisicamente associadas entre si. Essas associações aumentariam a eficiência das vias, visto que facilitariam o movimento do produto de uma enzima para o sítio ativo da próxima enzima na via. As evidências dessas associações provêm principalmente de experimentos em que um componente de uma via, cuidadosamente isolado da célula, está ligado a outros componentes da via. Todavia, essas observações levantam a seguinte pergunta: as enzimas associam-se entre si *in vivo* ou associam-se espuriamente durante o procedimento de isolamento? Evidências recentes *in vivo* mostram que as enzimas das vias de purina associam-se às outras quando há necessidade de síntese de purinas. Várias enzimas da via foram fundidas com a proteína fluorescente verde (ver Figura 2.65) e transfectadas para as células. Quando as células foram cultivadas na presença de purina, houve difusão disseminada de GFP por todo o citoplasma (Figura 25.8A). Quando as células foram transferidas para meios de crescimento sem purinas, a síntese de purinas começou, e as enzimas associaram-se entre si, formando complexos designados como *purinossomos* (Figura 25.8B). Esses experimentos foram repetidos com outras enzimas da via de síntese de purinas fusionadas a GFP, e os

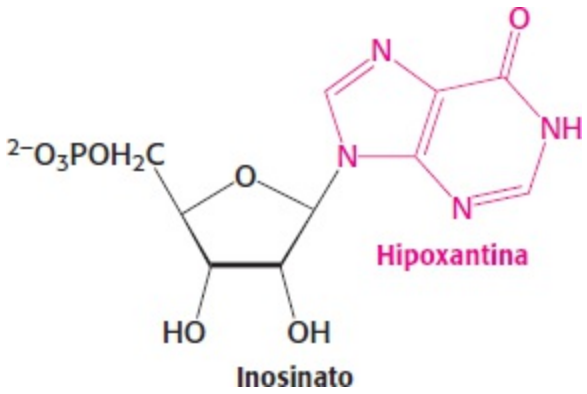
resultados foram os mesmos: ocorre síntese de purinas quando as enzimas formam purinossomos. O que na verdade provoca a formação de complexos? Embora os resultados ainda não estejam estabelecidos, parece que uma fosfatase, que presumivelmente responde de algum modo à ausência de purinas, induz a formação de complexos, enquanto uma quinase, que responde à presença de purinas, causa desmontagem do purinossomo.

As vias de recuperação economizam o gasto intracelular de energia

Conforme discutido anteriormente, a síntese *de novo* das purinas exige um investimento substancial de ATP. As vias de recuperação de purinas proporcionam um meio mais econômico de produção de purinas. As bases purínicas livres, derivadas da renovação de nucleotídios ou da alimentação, podem ligar-se a PRPP, formando monofosfatos de nucleosídios purínicos, em uma reação análoga à formação de orotidilato. Duas enzimas de recuperação com especificidades diferentes recuperam as bases purínicas. A *adenina fosforribosil transferase* catalisa a formação de adenilato (AMP):

$$\text{Adenina} + \text{PRPP} \rightarrow \text{adenilato} + PP_i$$

enquanto a *hipoxantina guanina fosforribosil transferase* (HGPRT) catalisa a formação de guanilato (GMP), bem como de *inosinato* (inosina monofosfato, IMP), um precursor de guanilato e de adenilato.



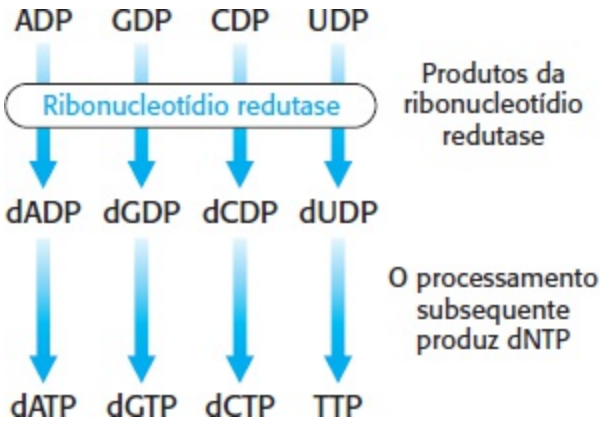
$$\text{Guanina} + \text{PRPP} \rightarrow \text{guanilato} + PP_i$$

$$\text{Hipoxantina} + \rightarrow \text{PRPP inosinato} + PP_i$$

25.3 Os desoxirribonucleotídios são sintetizados pela redução de ribonucleotídios por meio de um mecanismo de formação de radicais livres

Discutiremos agora a síntese de desoxirribonucleotídios. Esses precursores de DNA são formados pela redução de ribonucleotídios; especificamente, o grupo hidroxila na fração de ribose é substituído por um átomo de hidrogênio. Os substratos são difosfatos de ribonucleosídios, e o redutor final é o NADPH. A enzima *ribonucleotídio redutase* é responsável pela reação de redução para todos os quatro ribonucleotídios. As ribonucleotídio redutases de diferentes organismos constituem um conjunto notavelmente diversificado de enzimas. Entretanto, estudos detalhados revelaram que elas têm um mecanismo de reação em comum, e suas características de estrutura tridimensional

indicam que essas enzimas são homólogas. Analisemos a mais conhecida dessas enzimas, a de *E. coli* de vida aeróbica.



Mecanismo | Um radical tirosila é crítico para a ação da ribonucleotídio redutase

A ribonucleotídio redutase de *E. coli* é constituída de duas subunidades: R1 (um dímero de 87 kDa) e R2 (um dímero de 43 kDa). A subunidade R1 contém o sítio ativo, bem como dois sítios de controle alostéricos (Seção 25.4). Essa subunidade inclui três resíduos de cisteína conservados e um resíduo de glutamato, todos eles participam na redução da ribose a desoxirribose (Figura 25.9). O papel da subunidade R2 na catálise é gerar um notável radical livre em cada uma de suas duas cadeias. Cada cadeia R2 contém um *radical tirosila* estável com um elétron não pareado deslocado para seu anel aromático (Figura 25.10). Esse radical livre muito incomum é gerado por um *centro de ferro* de localização próxima, que consiste em dois íons férricos (Fe^{3+}) ligados por um íon oxido (O^{2-}).

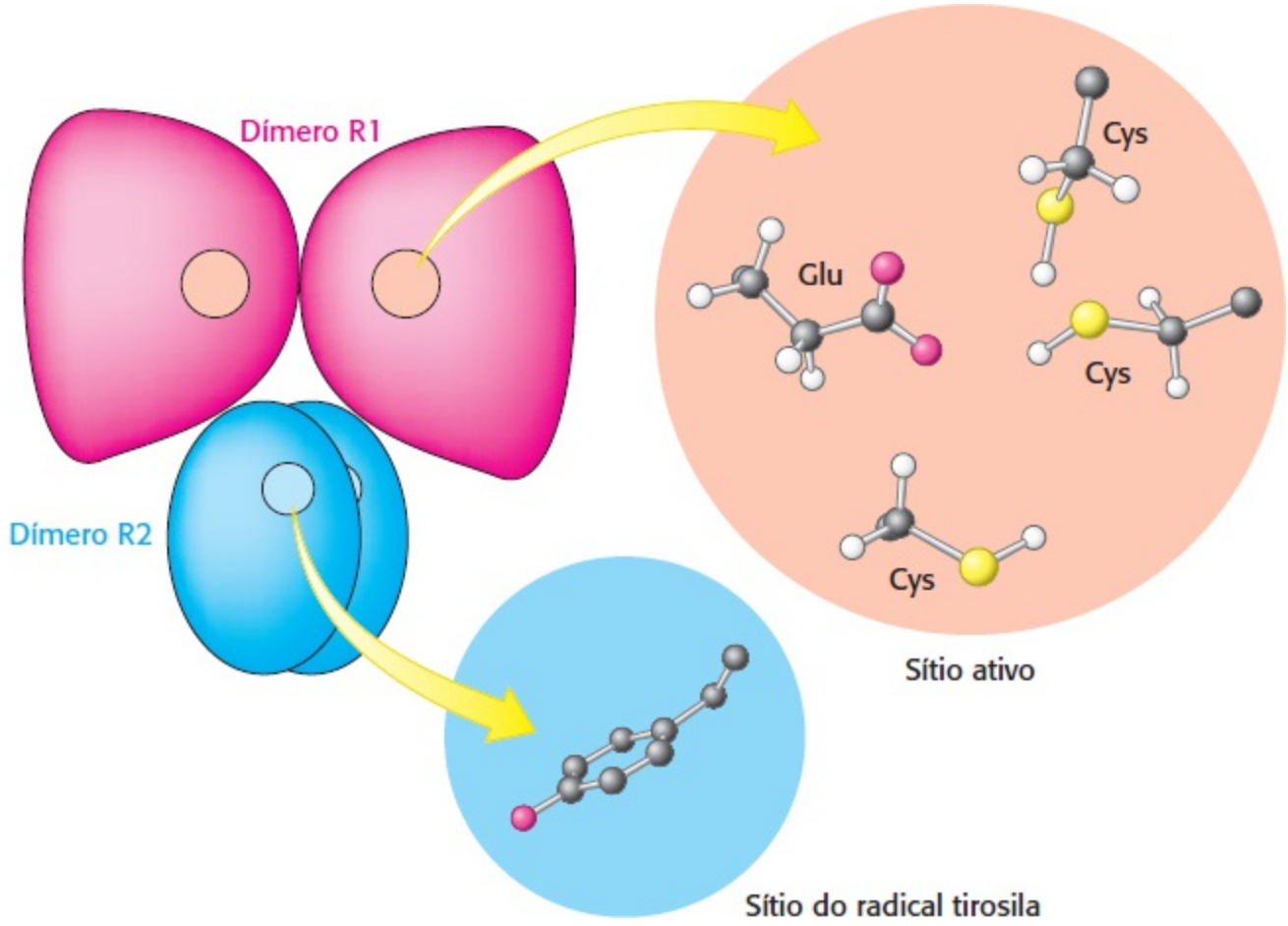


Figura 25.9 Ribonucleotídio redutase. A ribonucleotídio redutase reduz ribonucleotídios a desoxirribonucleotídios em seu

sítio ativo, que contém três resíduos de cisteína essenciais e um resíduo de glutamato. Cada subunidade R2 contém um radical de tirosila que aceita um elétron de um dos resíduos de cisteína no sítio ativo para iniciar a reação de redução. Duas subunidades R1 se juntam, formando um dímero, assim como duas subunidades R2.

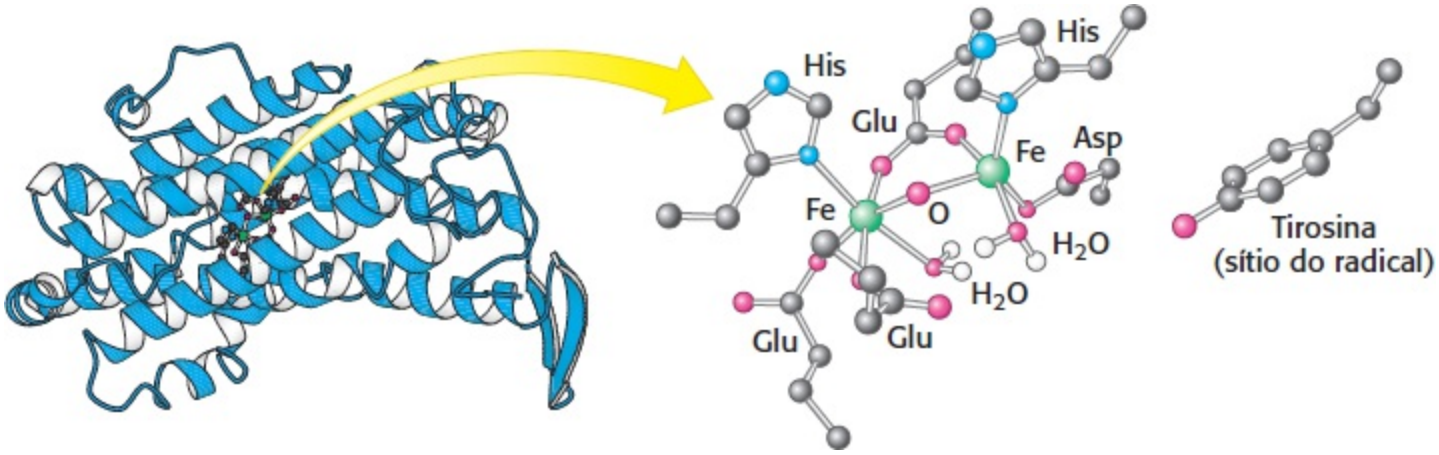


Figura 25.10 Subunidade R2 da ribonucleotídio redutase. A subunidade R2 contém um radical livre estável no resíduo de tirosina. Esse radical é gerado pela reação do oxigênio (não ilustrado) em um sítio adjacente contendo dois átomos de ferro. Duas subunidades R2 unem-se para formar um dímero. [Desenhada a partir de 1RIB.pdb.]

Na síntese de um desoxirribonucleotídio, a OH ligada ao C-2′ do anel da ribose é substituída por H, com retenção da configuração no átomo de carbono C-2 (Figura 25.11).

1. A reação começa com a transferência de um elétron de um resíduo de cisteína em R1 para o radical tirosila em R2. A perda de um elétron gera um *radical cisteína tiila* altamente reativo dentro do sítio ativo de R1.

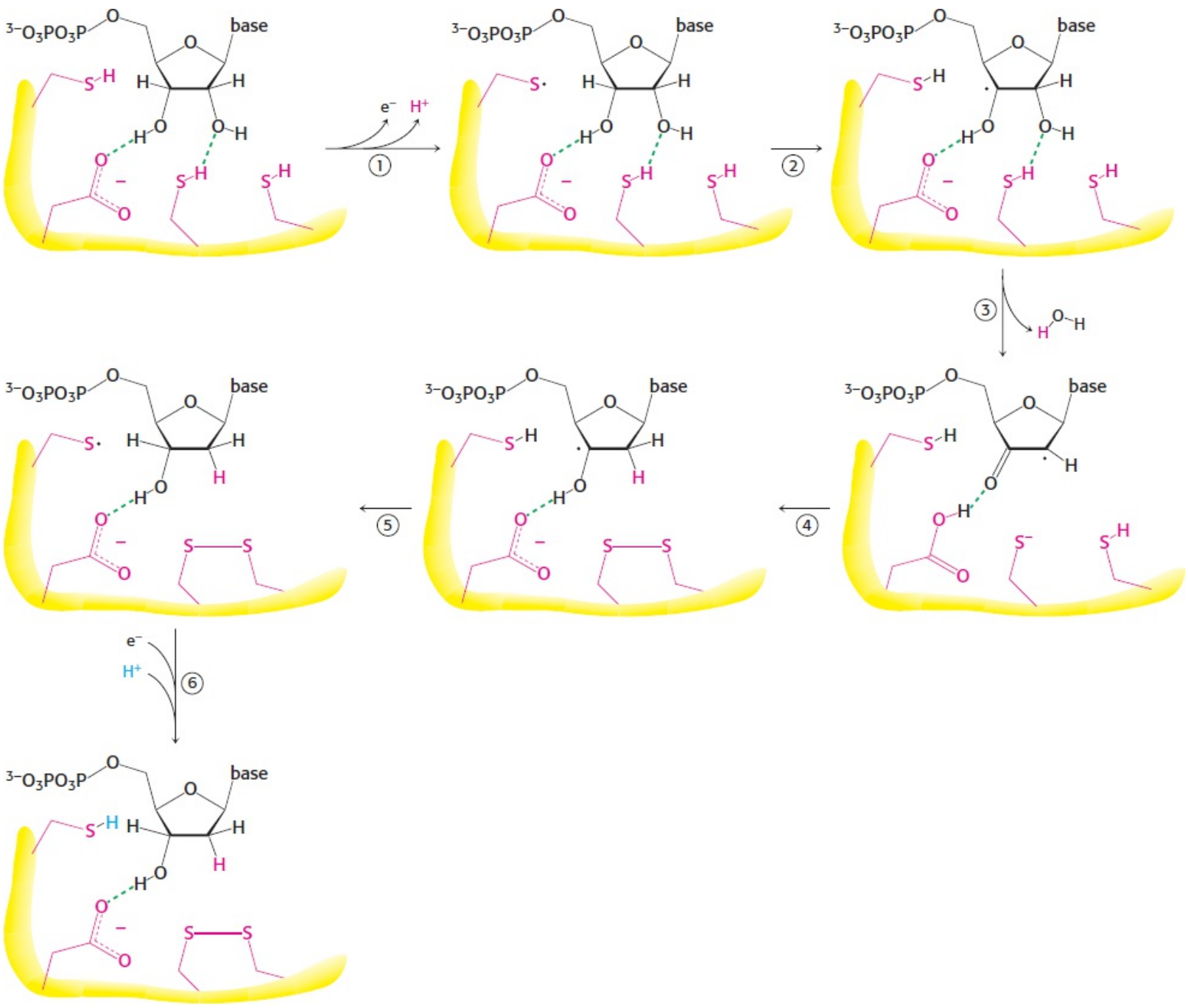


Figura 25.11 Mecanismo da ribonucleotídio redutase. **1.** Um elétron é transferido de um resíduo de cisteína em R1 para um radical de tirosina em R2, gerando um radical cisteína tiila altamente reativo. **2.** Esse radical retira um átomo de hidrogênio do C-3′ da unidade de ribose. **3.** O radical em C-3′ libera OH^- do átomo de carbono C-2′. Combinado a um próton de um segundo resíduo de cisteína, o OH^- é eliminado na forma de água. **4.** Um íon hidreto é transferido de um terceiro resíduo de cisteína com a formação concomitante de uma ponte de dissulfeto. **5.** O radical C-3′ capta novamente o átomo de hidrogênio originalmente retirado. **6.** Um elétron é transferido de R2 para reduzir o radical tiila que também aceita um próton. O desoxirribonucleotídio está livre para deixar R1. O dissulfeto formado no sítio ativo precisa ser reduzido para iniciar outro ciclo.

2. Em seguida, esse radical retira um átomo de hidrogênio do C-3′ da unidade de ribose, produzindo um radical nesse átomo de carbono.

3. O radical em C-3′ promove a liberação de OH^- do átomo de carbono C-2′. Protonada por um segundo resíduo de cisteína, OH^- sai na forma de uma molécula de água.

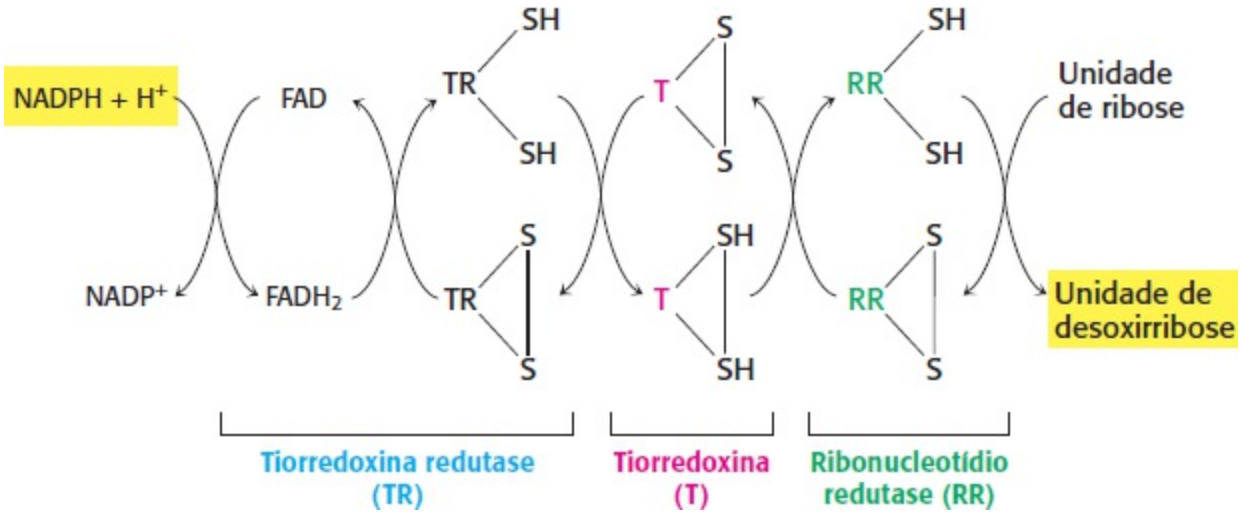
4. Um íon hidreto (um próton com dois elétrons) é então transferido de um terceiro resíduo de

cisteína para completar a redução da posição, formar uma ponte de dissulfeto e reconstituir um radical.

5. Esse radical em C-3′ volta a capturar o mesmo átomo de hidrogênio originalmente retirado pelo primeiro resíduo de cisteína, e o desoxirribonucleotídio fica livre para deixar a enzima.

6. O R2 fornece um elétron para reduzir o radical tiila. A ponte de dissulfeto gerada no sítio ativo da enzima precisa ser então reduzida, regenerando a enzima ativa.

Os elétrons para essa redução provêm do NADPH, mas não de modo direto. Um carreador com poder redutor ligando o NADPH com a redutase é a *tiorredoxina*, uma proteína de 12 kDa com dois resíduos expostos de cisteína próximos um do outro. Essas sulfidrilas são oxidadas a um dissulfeto, em uma reação catalisada pela própria ribonucleotídio redutase. Por sua vez, a tiorredoxina reduzida é regenerada pelo fluxo de elétrons do NADPH. Essa reação é catalisada pela *tiorredoxina redutase*, uma flavoproteína. Os elétrons fluem do NADPH para o FAD ligado da redutase até o dissulfeto da tiorredoxina oxidada, a seguir, para a ribonucleotídio redutase e, por fim, para a unidade de ribose.



Radicais estáveis distintos do radical tirosila são empregados por outras ribonucleotídio redutases

Ribonucleotídio redutases que não contêm radical tirosila foram caracterizadas em outros organismos. Com efeito, essas enzimas contêm outros radicais estáveis que são gerados por outros processos. Por exemplo, em uma classe de redutases, a coenzima adenosilcobalamina (vitamina B_{12}) constitui a fonte de radical. Apesar de diferenças no radical estável empregado, os sítios ativos dessas enzimas assemelham-se aos da ribonucleotídio redutase de *E. coli* e parecem atuar pelo mesmo mecanismo, com base na reatividade excepcional de radicais de cisteína. Por conseguinte, essas enzimas apresentam um ancestral comum, porém desenvolveram uma variedade de mecanismos para gerar radicais estáveis que funcionam bem em diferentes condições de crescimento. As enzimas primordiais parecem ter sido inativadas pelo oxigênio, enquanto enzimas como a de *E. coli* utilizam o oxigênio para gerar o radical tirosila inicial. Observe que a redução de ribonucleotídios a desoxirribonucleotídios é uma reação quimicamente difícil, que provavelmente exige um catalisador sofisticado. A existência de uma estrutura enzimática comum para esse processo sugere fortemente que as proteínas se juntaram ao mundo do RNA antes da evolução do DNA como

forma de armazenamento estável de informação genética.

O timidilato é formado pela metilação do desoxiuridilato

A uracila, que é produzida pela via de síntese das pirimidinas, não é um componente do DNA. Com efeito, o DNA contém timina, um análogo metilado da uracila. Outra etapa é necessária para gerar timidilato a partir da uracila. A *timidilato sintase* catalisa essa etapa final: o desoxiuridilato (dUMP) é metilado a timidilato (TMP). Convém lembrar que a timidilato sintase também atua nas vias de recuperação da timina. Conforme descrito no Capítulo 28, a metilação desse nucleotídio marca os locais de lesão do DNA para reparo e, portanto, ajuda a preservar a integridade da informação genética armazenada no DNA. O doador de metila nessa reação é o N^5, N^{10}-metileno-tetra-hidrofolato, e não a *S*-adenosilmetionina (Seção 24.2).

O grupo metila liga-se ao átomo de C-5 do anel aromático do dUMP, porém esse átomo de carbono não é um nucleófilo adequado e não pode atacar o grupo apropriado no doador de metila. A timidilato sintase promove a metilação acrescentando um tiolato de uma cadeia lateral de cisteína a esse anel, produzindo uma espécie nucleofílica capaz de atacar o grupo metileno do N^5, N^{10}-metileno-tetra-hidrofolato (Figura 25.12). Por sua vez, esse grupo metileno é ativado por distorções impostas pela enzima, que favorecem a abertura do anel de cinco membros. O ataque do dUMP ativado no grupo metileno forma a nova ligação carbono-carbono. O intermediário formado é então convertido em produto: o íon hidreto é transferido do anel de tetra-hidrofolato para transformar o grupo metileno em um grupo metila, e um próton é retirado do átomo de carbono portador do grupo metila para eliminar a cisteína e regenerar o anel aromático. O derivado tetra-hidrofolato perde tanto o grupo metileno quanto um íon hidreto e, portanto, é oxidado a di-hidrofolato. Para a síntese de mais timidilato, o tetra-hidrolato precisa ser regenerado.

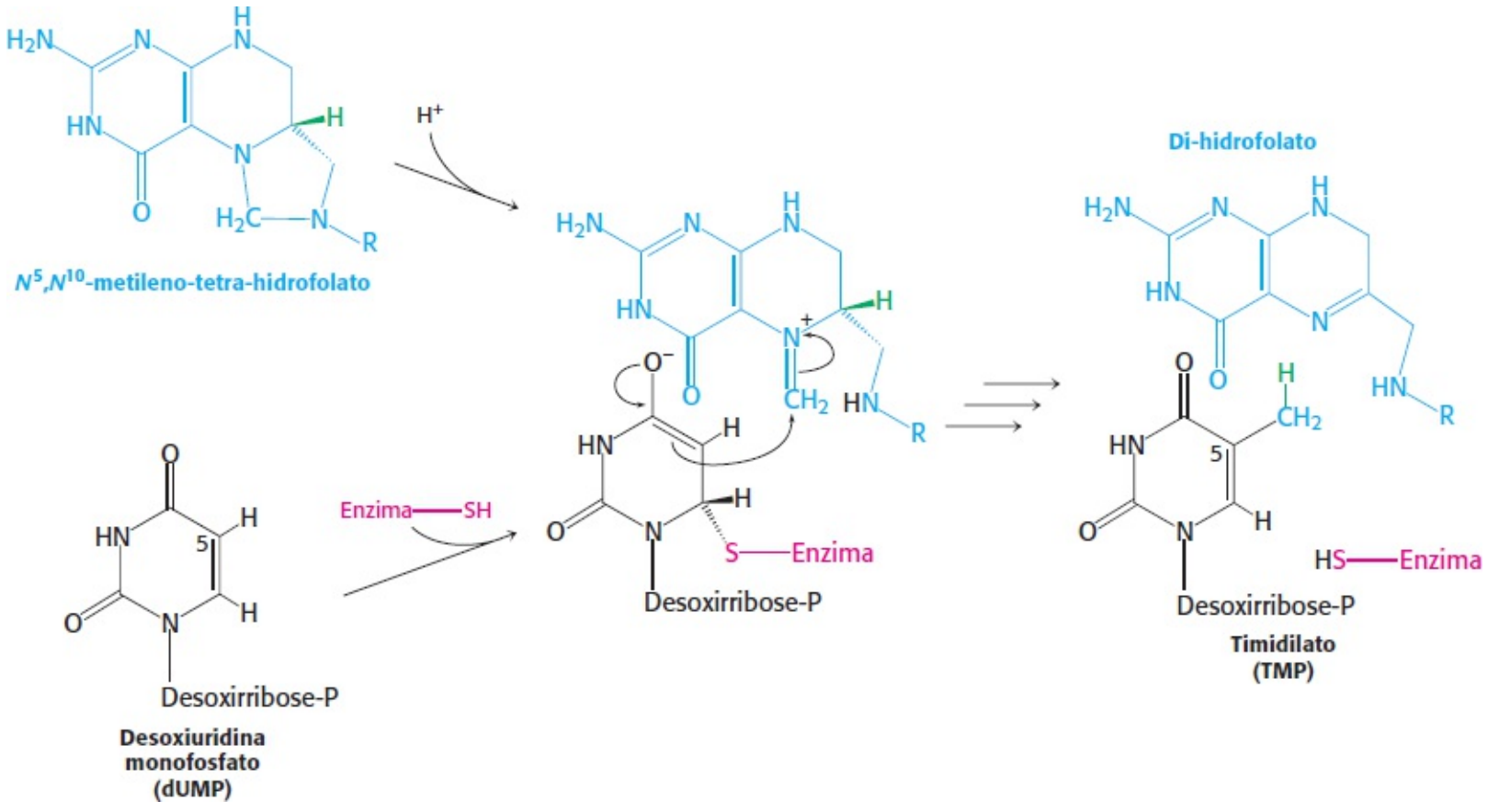
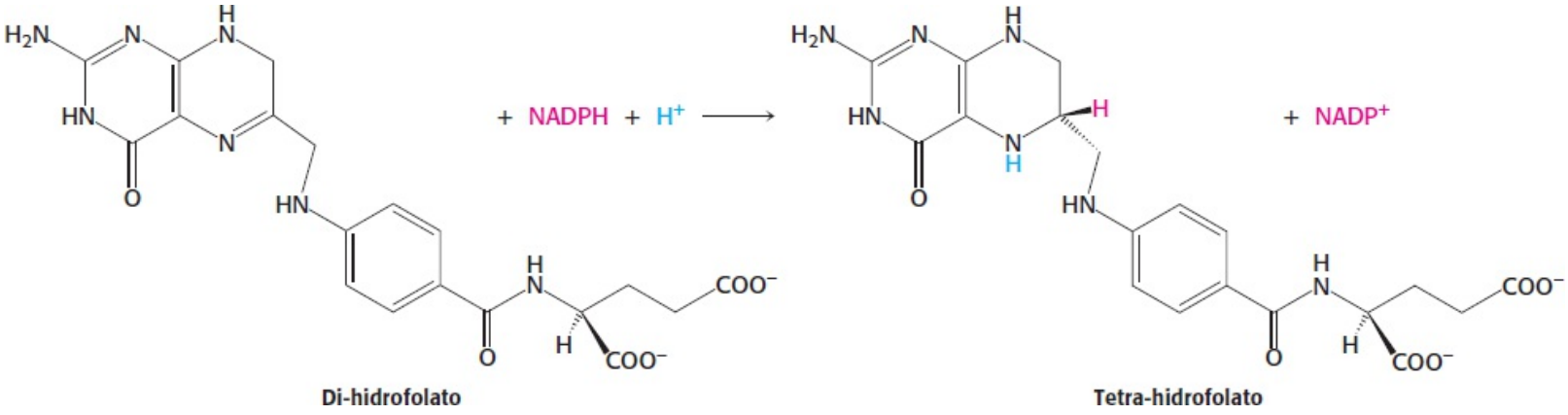


Figura 25.12 Síntese de timidilato. A timidilato sintase catalisa a adição de um grupo metila (derivado do N^5, N^{10}-metileno-tetra-hidrofolato) ao dUMP, formando TMP. A adição de um tiolato da enzima ativa o dUMP. A abertura do anel de cinco membros do derivado de THF prepara o grupo metileno para o ataque nucleofílico pelo dUMP ativado. A reação é completada pela transferência de um íon hidreto, formando o di-hidrofolato.

A di-hidrofolato redutase catalisa a regeneração do tetra-hidrofolato, um carreador de um carbono

O tetra-hidrofolato é regenerado a partir do di-hidrofolato que é produzido na síntese de timidilato. Essa regeneração é efetuada pela *di-hidrofolato redutase*, com a utilização de NADPH como redutor.



Um íon hidreto é transferido diretamente do anel nicotinamida do NADPH para o anel pteridina do di-hidrofolato. O di-hidrofolato ligado e o NADPH são mantidos em estreita proximidade para facilitar a transferência de hidreto.

Vários fármacos antineoplásicos valiosos bloqueiam a síntese de timidilato

As células que se dividem rapidamente necessitam de um suprimento abundante de timidilato para a síntese de DNA. A vulnerabilidade dessas células à inibição da síntese de TMP tem sido explorada no tratamento do câncer. A timidilato sintase e a di-hidrofolato redutase constituem os alvos de escolha da quimioterapia (Figura 25.13).

A *fluoruracila*, um agente antineoplásico, é convertida *in vivo* em *fluorodesoxiuridilato* (F-dUMP). Esse análogo do dUMP inibe irreversivelmente a timidilato sintase após atuar como substrato normal em parte do ciclo catalítico. Convém lembrar que a formação de TMP exige a remoção de um próton (H^+) do C-5 do nucleotídio ligado (ver Figura 25.12). Entretanto, a enzima não pode retirar F^+ do F-dUMP, de modo que a catálise é bloqueada no estágio do complexo covalente formado pelo F-dUMP, metileno tetra-hidrofolato e grupo sulfidrila da enzima (Figura 25.14). Temos aqui um exemplo de *inibição suicida*, em que uma enzima converte um substrato em um inibidor reativo que interrompe a atividade catalítica da enzima (Seção 8.5).

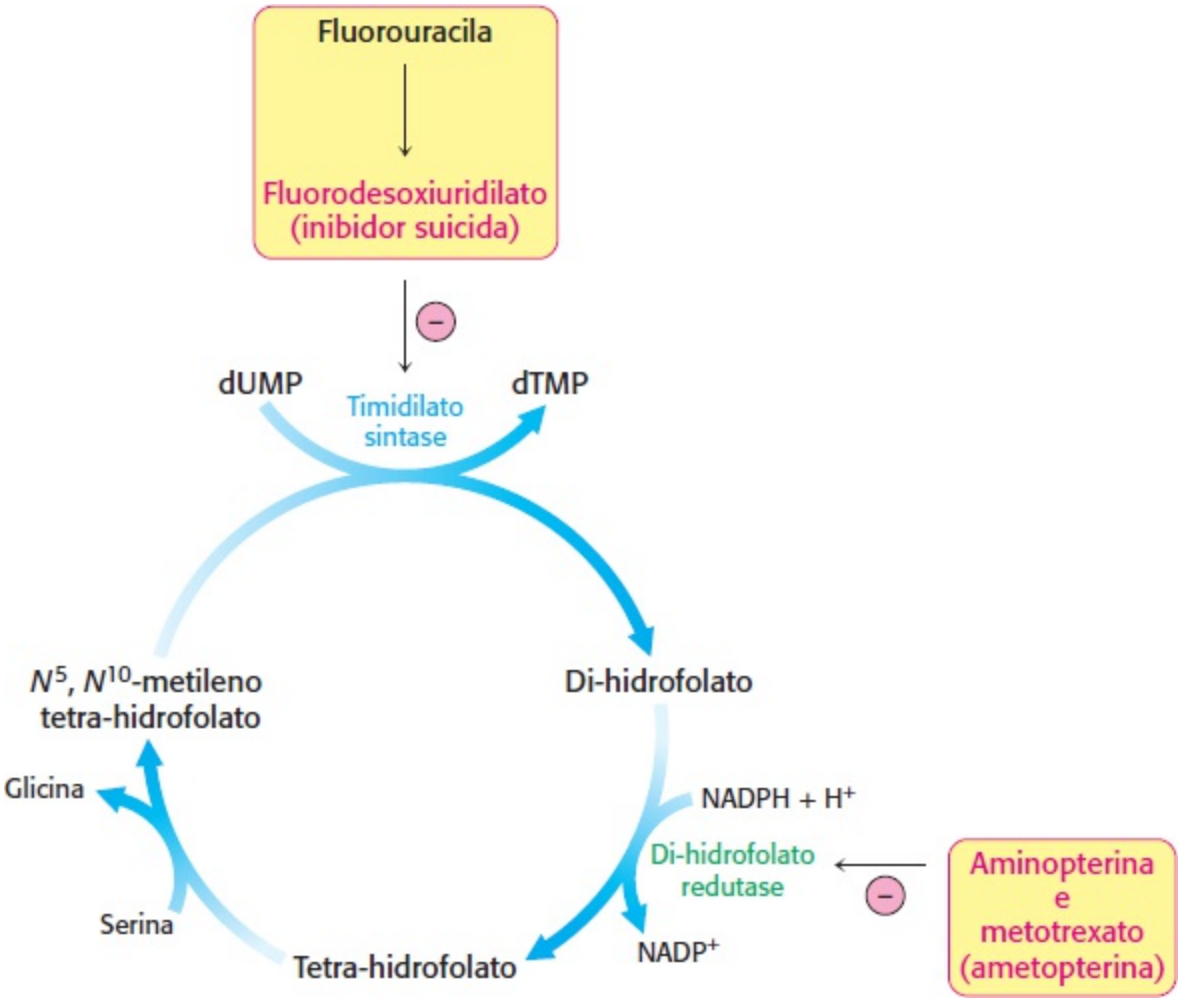


Figura 25.13 Alvos de fármacos antineoplásicos. A timidilato sintase e a di-hidrofolato redutase constituem alvos de escolha na quimioterapia do câncer, visto que a produção de grandes quantidades de precursores na síntese de DNA é necessária para as células cancerosas em rápida divisão.

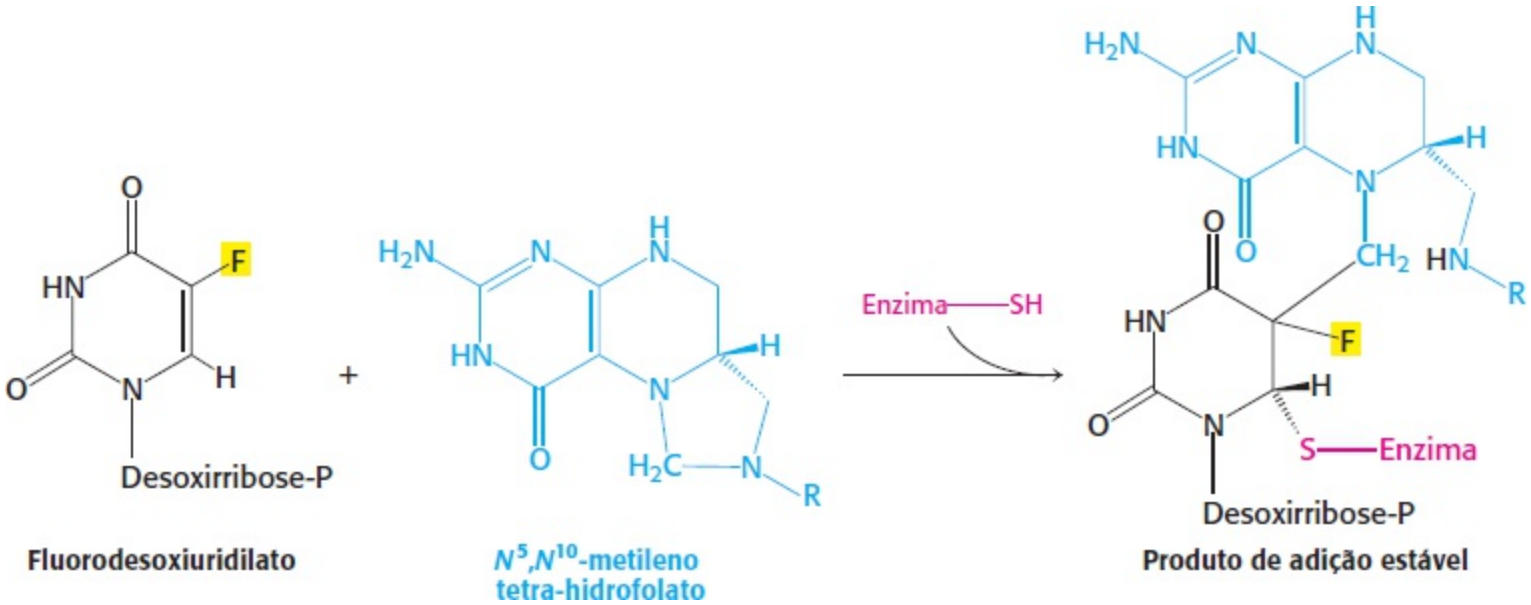
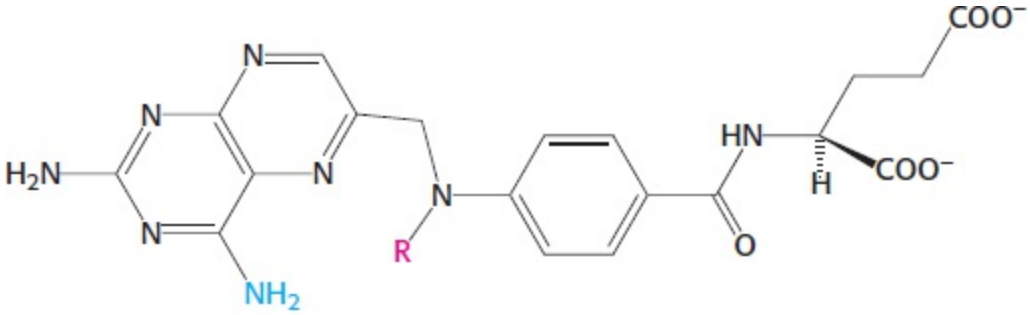


Figura 25.14 Inibição suicida. O fluorodesoxiuridilato (produzido a partir da fluoruracila) bloqueia a timidilato sintase em uma forma que não pode prosseguir na via de reação.

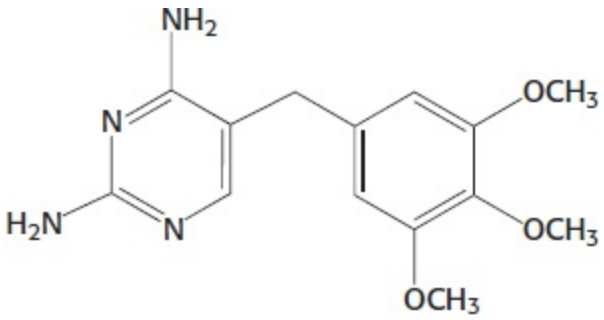
A síntese de TMP também pode ser bloqueada ao inibir a regeneração do tetra-hidrofolato. Os análogos do di-hidrofolato, como a *aminopterina* e o *metotrexato* (ametopterina), são potentes inibidores competitivos ($K_i < 1$ nM) da di-hidrofolato redutase.



Aminopterina (R = H) ou metotrexato (R = CH_3)

O metotrexato é um fármaco valioso no tratamento de muitos tumores de crescimento rápido, como os da leucemia aguda e coriocarcinoma, um câncer derivado de células placentárias. Entretanto, o metotrexato mata as células em rápida replicação, sejam elas malignas ou não. As células-tronco na medula óssea, as células epiteliais do trato intestinal e os folículos pilosos são vulneráveis à ação desse antagonista do folato, explicando, assim, os seus efeitos colaterais tóxicos, que incluem enfraquecimento do sistema imune, náuseas e queda dos cabelos.

Os análogos do folato, como a *trimetoprima*, têm potente atividade antibacteriana e antiprotozoária. A trimetoprima liga-se 10^5 vezes menos firmemente à di-hidrofolato redutase de mamíferos do que às redutases dos microrganismos suscetíveis. Pequenas diferenças nas fendas dos sítios ativos dessas enzimas são responsáveis pela sua ação antimicrobiana altamente seletiva. A combinação de trimetoprima com sulfametoxazol (um inibidor da síntese de folato) é amplamente usada no tratamento de infecções.



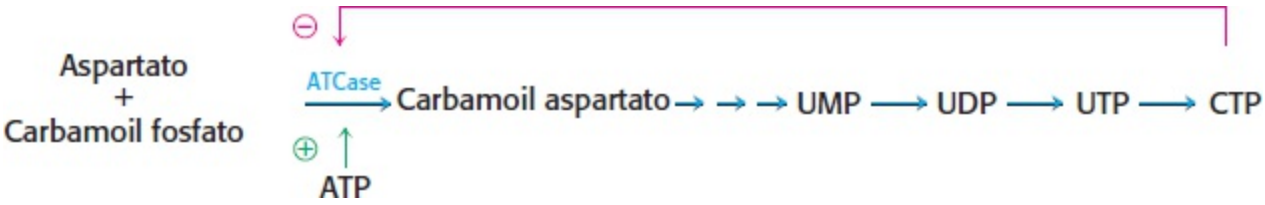
Trimetoprima

25.4 As etapas essenciais na biossíntese de nucleotídios são reguladas por inibição por retroalimentação

A biossíntese de nucleotídios é regulada por inibição por retroalimentação de modo semelhante à regulação da biossíntese de aminoácidos (Seção 24.3). Essas vias de regulação asseguram a produção dos vários nucleotídios nas quantidades necessárias.

A biossíntese de pirimidinas é regulada pela aspartato transcarbamoilase

A aspartato transcarbamoilase, uma das enzimas essenciais na regulação da biossíntese de pirimidinas nas bactérias, foi descrita detalhadamente no Capítulo 10. Convém lembrar que a *ATCase é inibida pela CTP, o produto final da biossíntese de pirimidinas, e estimulada pelo ATP.*



A carbamoil fosfato sintetase também constitui um ponto de inibição por retroalimentação tanto nos procariotos quanto nos eucariotos.

A síntese de nucleotídios purínicos é controlada por inibição por retroalimentação em vários locais

O esquema de regulação para os nucleotídios purínicos é mais complexo do que aquele dos nucleotídios pirimidínicos (Figura 25.15).

1. A etapa comprometida na biossíntese de nucleotídios purínicos é a conversão do PRPP em fosforribosilamina pela *glutamina fosforribosil amidotransferase*. Essa enzima importante sofre inibição por retroalimentação por muitos ribonucleotídios purínicos. É importante assinalar que o AMP e o GMP, os produtos finais da via, são sinérgicos na inibição da aminotransferase.

2. O inosinato é o ponto de ramificação na síntese de AMP e GMP. *As reações que se afastam do inosinato constituem locais de inibição por retroalimentação.* O AMP inibe a conversão do inosinato em adenilsuccinato, o seu precursor imediato. De modo semelhante, o GMP inibe a conversão do inosinato em xantilato, seu precursor imediato.

3. Conforme assinalado anteriormente, o GTP é um substrato na síntese de AMP, enquanto o ATP é um substrato na síntese de GMP. Essa *relação recíproca de substratos* tende a equilibrar a síntese dos adenina e guanina ribonucleotídios.

Observe que a síntese de PRPP por PRPP sintetase é altamente regulada, embora não constitua a etapa comprometida na síntese de purinas. Foram identificadas mutações em PRPP sintetases que resultam em perda da resposta alostérica a nucleotídios, sem qualquer efeito sobre a atividade catalítica da enzima. Uma das consequências dessa mutação consiste na excessiva abundancia de nucleotídios purínicos, que podem resultar no desenvolvimento de gota, um distúrbio patológico discutido posteriormente neste capítulo.

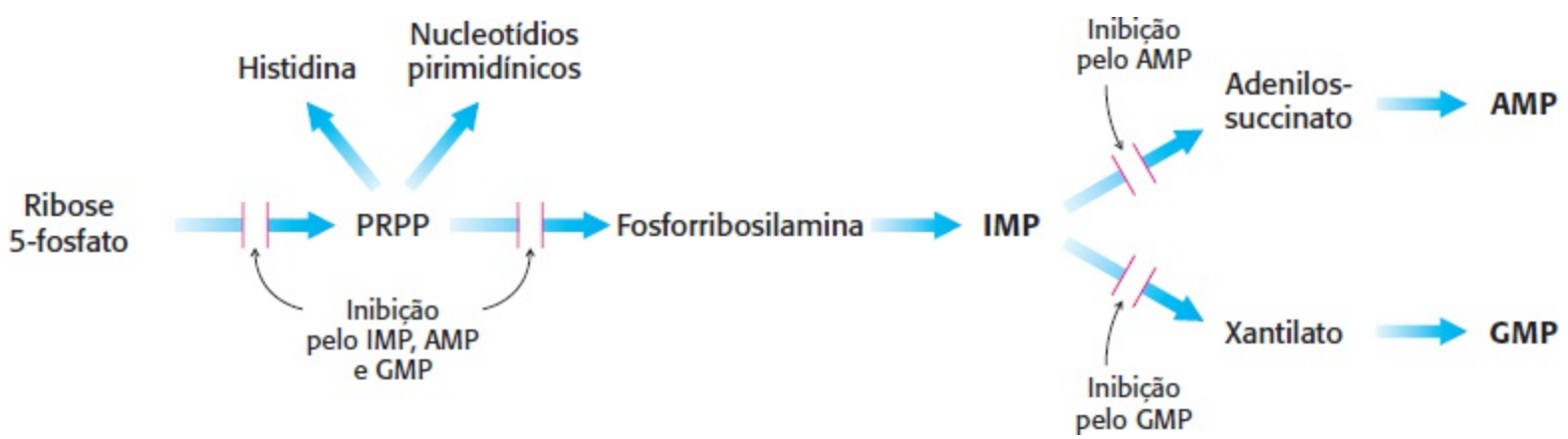


Figura 25.15 Controle da biossíntese de purinas. A inibição por retroalimentação controla tanto a taxa global de

biossíntese de purinas quanto o equilíbrio entre a produção de AMP e GMP.

A síntese de desoxirribonucleotídios é controlada pela regulação da ribonucleotídio redutase

A redução de ribonucleotídio a desoxirribonucleotídio é controlada de maneira precisa por interações alostéricas. Cada polipeptídio da subunidade R1 da ribonucleotídio redutase de *E. coli* aeróbica contém dois sítios alostéricos: um deles controla a *atividade global* da enzima, enquanto o outro regula a especificidade de substrato (Figura 25.16). A atividade catalítica global da ribonucleotídio redutase é diminuída pela ligação do dATP, o que sinaliza abundância de desoxirribonucleotídios. A ligação do ATP reverte essa inibição por retroalimentação. A ligação de dATP ou ATP ao sítio de controle de especificidade de substratos aumenta a redução de UDP e CDP, os nucleotídios pirimidínicos. A ligação de timidina trifosfato (TTP) promove a redução do GDP e inibe a redução posterior de ribonucleotídios pirimidínicos. O aumento subsequente no nível de dGTP estimula a redução do ATP a dATP. Esse padrão complexo de regulação é responsável pelo equilíbrio apropriado dos quatro desoxirribonucleotídios necessários para a síntese de DNA.

25.5 Os distúrbios no metabolismo de nucleotídios podem causar condições patológicas

Os nucleotídios são vitais para inúmeros processos bioquímicos. Por conseguinte, não é surpreendente que a perturbação do metabolismo de nucleotídios tenha uma variedade de efeitos fisiológicos. Os nucleotídios de uma célula sofrem renovação contínua. Os nucleotídios são degradados por hidrólise a nucleosídios por *nucleotidases*. A clivagem fosforolítica dos nucleosídios a bases livres e ribose 1-fosfato (ou desoxirribose 1-fosfato) é catalisada por *nucleosídios fosforilases*. A ribose 1-fosfato é isomerizada pela *fosforribomutase* a ribose 5-fosfato, um substrato na síntese de PRPP. Algumas das bases são novamente utilizadas na formação de nucleotídios pela via de recuperação. Outras são degradadas a produtos que são excretados (Figura 25.17). A deficiência de uma enzima pode interromper estas vias, levando a uma condição patológica.

A perda de atividade da adenosina desaminase resulta em imunodeficiência combinada grave

A via de degradação do AMP inclui uma etapa adicional, visto que a adenosina não é um substrato da nucleosídio fosforilase. Em primeiro lugar, o fosfato é removido por uma nucleotidase, produzindo o nucleosídio adenosina (ver Figura 25.17). Na etapa adicional, a adenosina é desaminada pela adenosina desaminase, formando inosina.

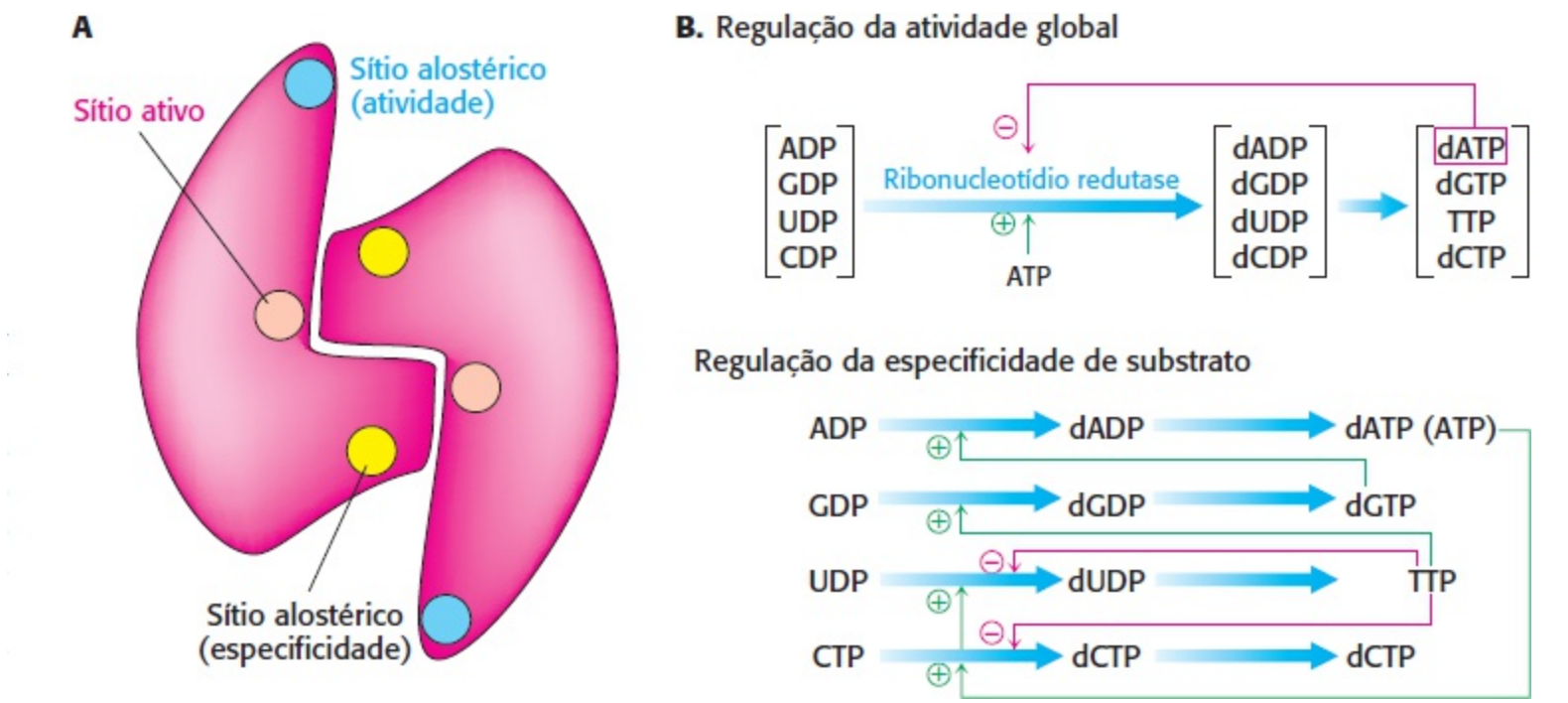


Figura 25.16 Regulação da ribonucleotídio redutase. A. Cada subunidade no dímero R1 contém dois sítios alostéricos além do sítio ativo. Um sítio regula a atividade global, e o outro regula a especificidade de substrato. **B.** Padrões de regulação em relação a diferentes nucleosídio difosfatos demonstrados pela ribonucleotídio redutase.

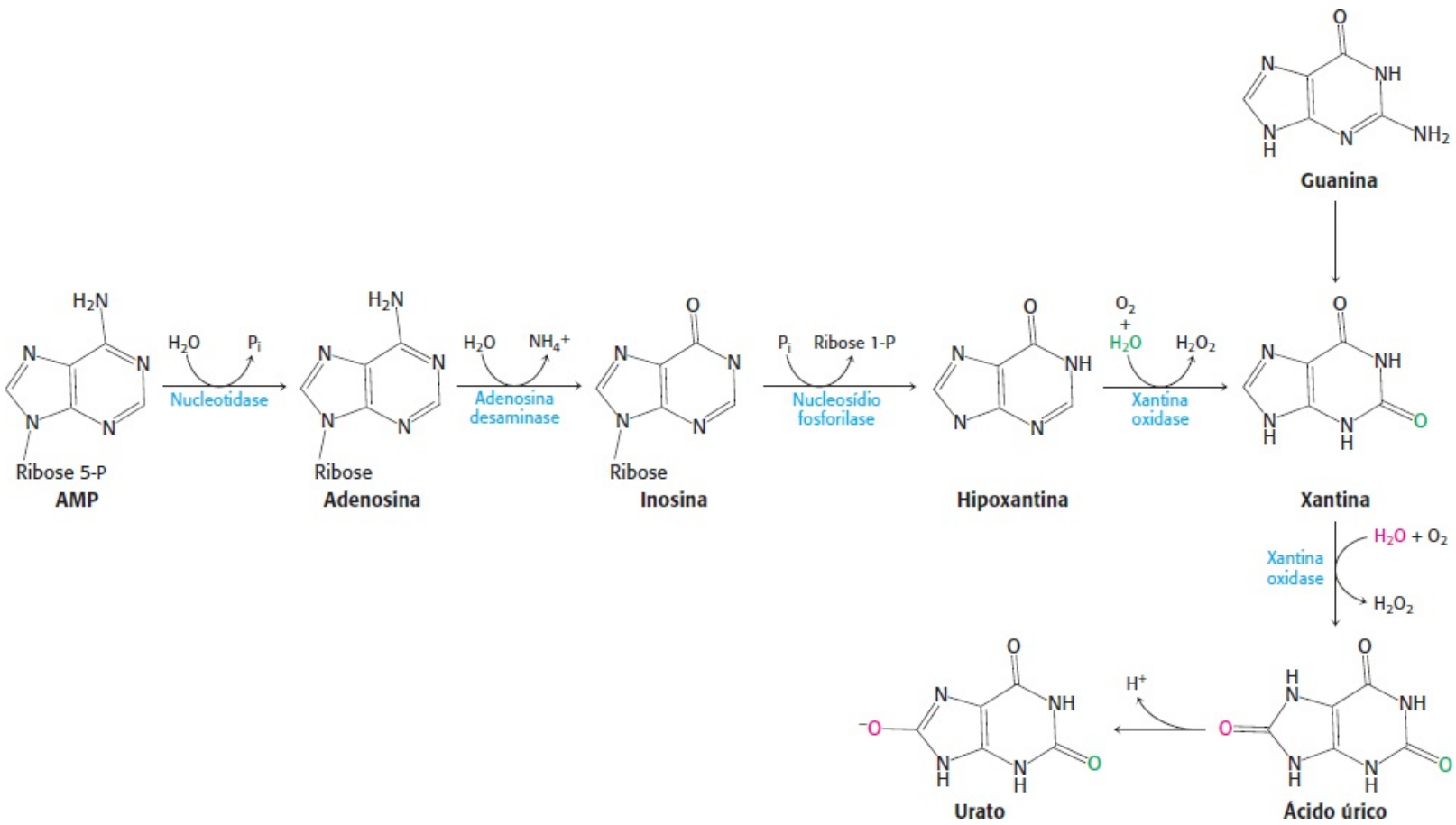


Figura 25.17 Catabolismo das purinas. As bases purínicas são inicialmente convertidas em xantina e, a seguir, em urato para excreção. A xantina oxidase catalisa duas etapas nesse processo.

A ocorrência de deficiência na atividade de adenosina desaminase está associada a algumas formas de *imunodeficiência combinada grave* (IDCG), um distúrbio imunológico. Os indivíduos com este distúrbio apresentam infecções recorrentes graves, que frequentemente levam à morte em

idade precoce. A IDCG caracteriza-se por perda de células T, que são cruciais na resposta imune (Seção 34.5). Embora a base bioquímica do distúrbio ainda não esteja claramente estabelecida, a ausência de adenosina desaminase resulta em aumento de 50 a 100 vezes o nível normal de dATP, inibindo a ribonucleotídio redutase e, consequentemente, a síntese de DNA. Além disso, a própria adenosina é uma molécula de sinalização poderosa, que desempenha um papel em diversas vias de regulação. A perturbação nos níveis de adenosina também pode ser deletéria. A IDCG é frequentemente designada como "doença do menino na bolha", visto que o seu tratamento pode incluir o isolamento completo do paciente de seu ambiente. A deficiência de adenosina desaminase tem sido tratada com sucesso com terapia gênica.

A gota é induzida por altos níveis séricos de urato

A inosina produzida pela adenosina desaminase é metabolizada subsequentemente pela *nucleosídio fosforilase* a hipoxantina. A *xantinoxidase*, uma flavoproteína contendo ferro e molibdênio oxida a hipoxantina a *xantina* e, em seguida, a ácido úrico. O oxigênio molecular, que é o oxidante em ambas as reações, é reduzido a H_2O_2, que é decomposto a H_2O e O_2 pela catalase. O ácido úrico perde em próton em pH fisiológico, formando *urato*. *Nos seres humanos, o urato é o produto final da degradação das purinas e é excretado na urina.*

Os níveis séricos elevados de urato (hiperuricemia) induzem *gota*, uma doença dolorosa das articulações. Nessa doença, o sal sódico de urato cristaliza no líquido e no revestimento das articulações (Figura 25.18). A pequena articulação na base do hálux constitui um local comum de acúmulo de urato de sódio, embora o sal também se acumule em outras articulações. Ocorre inflamação dolorosa quando as células do sistema imune fagocitam os cristais de urato de sódio. Os rins também podem ser lesionados pelo depósito de cristais de urato. A gota é um problema clínico comum, que acomete 1% da população dos países ocidentais. É nove vezes mais comum nos homens do que nas mulheres.

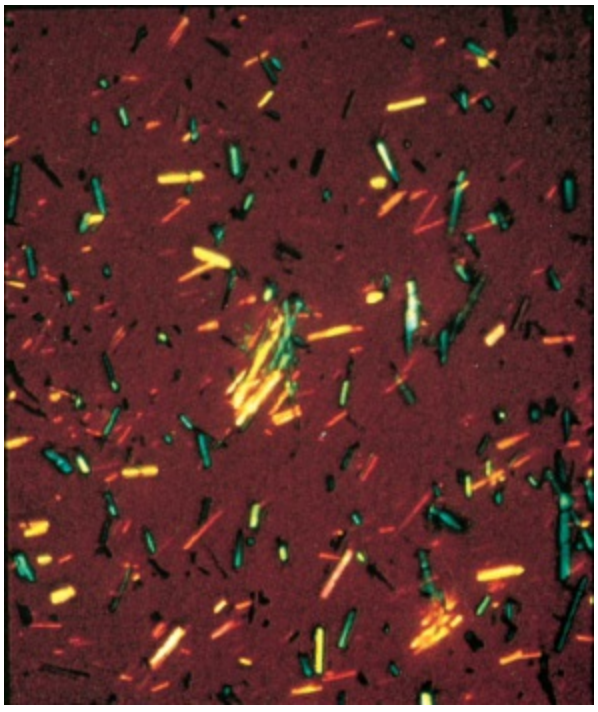
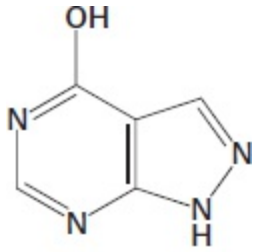


Figura 25.18 Micrografia de cristais de urato de sódio. O acúmulo desses cristais provoca lesão das articulações e dos rins. [Cortesia do Dr. James McGuire.]

A administração de *alopurinol*, um análogo da hipoxantina, constitui um tratamento para a gota. O mecanismo de ação do alopurinol é interessante: o fármaco atua *inicialmente como substrato e, em seguida, como inibidor* da xantina oxidase. A oxidase hidroxila o alopurinol a *aloxantina* (*oxipurinol*), que então permanece firmemente ligada ao sítio ativo. A ligação da aloxantina mantém o átomo de molibdênio da xantinoxidase no estado de oxidação +4, em lugar de fazê-lo retornar ao estado de oxidação +6, conforme observado no ciclo catalítico normal. Temos aqui outro exemplo de *inibição suicida*.

A síntese de urato a partir da hipoxantina e xantina diminui pouco depois da administração de alopurinol. As concentrações séricas de hipoxantina e xantina aumentam, enquanto a concentração sérica de urato cai.



Alopurinol

Nos seres humanos, o nível sérico medido de urato aproxima-se do limite de solubilidade. Em contrapartida, os prossímios (como os lêmures) apresentam níveis dez vezes menores. Ocorreu um notável aumento dos níveis de urato na evolução dos primatas. Qual é a vantagem seletiva de um nível de urato tão alto que está à beira da fronteira para a gota em muitos indivíduos? Pode-se verificar que o urato tem uma ação acentuadamente benéfica. O urato é um removedor altamente efetivo das espécies reativas de oxigênio. Com efeito, o urato é quase tão efetivo quanto o ascorbato (vitamina C) como antioxidante. O nível aumentado de urato nos seres humanos, em comparação com os prossímios e outros primatas inferiores, pode contribuir significativamente com o maior tempo de vida nos seres humanos e para reduzir a incidência de câncer humano.

A síndrome de Lesch-Nyhan representa uma consequência devastadora de mutações em uma enzima da via de recuperação

As mutações em genes que codificam enzimas de biossíntese de nucleotídios podem reduzir os níveis de nucleotídios necessários e levar ao acúmulo de intermediários. A ausência quase total de hipoxantina-guanina fosforribosil transferase tem consequências inesperadas e devastadoras. A expressão mais notável desse erro inato do metabolismo, denominado *síndrome de Lesch-Nyhan*, consiste em um *comportamento autodestrutivo compulsivo*. Aos 2 ou 3 anos de idade, as crianças com essa doença começam a morder os dedos e os lábios, destruindo-os se não forem contidas. Essas crianças também se comportam de modo agressivo em relação aos outros. A *deficiência mental e a espasticidade* constituem outras características da síndrome de Lesch-Nyhan. Os níveis elevados de urato no soro levam à formação de cálculos renais no início da vida, seguidos de sintomas de gota dentro de vários anos. A doença é herdada como distúrbio recessivo ligado ao sexo.

As consequências bioquímicas da ausência virtual de hipoxantina-guanina fosforribosil transferase consistem em *concentração elevada de PRPP*, *acentuado aumento na taxa de biossíntese de purinas pela via* de novo*, e superprodução de urato*. A relação entre a ausência da transferase e os

sinais neurológicos bizarros continua sendo um enigma, embora evidências recentes tenham sugerido que a ausência de hipoxantina-guanina fosforribosil transferase, resulte, de algum modo não definido, em desequilíbrio de neurotransmissores essenciais. A síndrome de Lesch-Nyhan demonstra que a via de recuperação para a síntese de IMP e de GMP não é gratuita. Além disso, a síndrome de Lesch-Nyhan revela que o *comportamento anormal, como automutilação e extrema hostilidade, pode ser causado pela ausência de uma única enzima.* A psiquiatria sem dúvida alguma irá se beneficiar da elucidação da base molecular desses transtornos mentais.

A deficiência de ácido fólico provoca defeitos congênitos, como a espinha bífida

A *espinha bífida* é uma das classes de defeitos congênitos caracterizados pela formação incompleta ou incorreta do tubo neural no início do desenvolvimento. Nos EUA, a prevalência de defeitos do *tubo neural* é de aproximadamente 1 caso em 1.000 nascimentos. Diversos estudos demonstraram que a prevalência de defeitos do tubo neural é reduzida em até 70% quando as mulheres tomam ácido fólico como suplemento alimentar antes e durante o primeiro trimestre de gravidez. Uma hipótese é a de que são necessários mais derivados do folato para a síntese de precursores do DNA quando a divisão celular é frequente e quando quantidades substanciais de DNA precisam ser sintetizadas.

Resumo

25.1 O anel pirimidínico é montado *de novo* ou recuperado por vias de recuperação

O anel pirimidínico é inicialmente montado e, em seguida, ligado à ribose fosfato para formar um nucleotídio pirimidínico. O 5-fosforribosil-1-pirofosfato é o doador da fração ribose fosfato. A síntese do anel pirimidínico começa com a formação de carbamoil aspartato a partir de carbamoil fosfato e aspartato, em uma reação catalisada pela aspartato transcarbamoilase. A desidratação, a ciclização e a oxidação produzem orotato, que reage com o PRPP, dando origem ao orotidilato. A descarboxilação desse nucleotídio pirimidínico produz UMP. A CTP é então formada pela aminação da UTP.

25.2 As bases purínicas podem ser sintetizadas *de novo* ou recicladas por vias de recuperação

O anel purínico é montado a partir de uma variedade de precursores: glutamina, glicina, aspartato, N^{10}-formil-tetra-hidrofolato e CO_2. A etapa comprometida na síntese *de novo* de nucleotídios purínicos é a formação de 5-fosforribosilamina a partir de PRPP e glutamina. O anel purínico é montado sobre a ribose fosfato, contrastando com a síntese *de novo* dos nucleotídios pirimidínicos. A adição de glicina, seguida de formilação, aminação e fechamento do anel, produz 5-aminoimidazol ribonucleotídio. Esse intermediário contém o anel de cinco membros completo do esqueleto de purina. A adição de CO_2, do átomo de nitrogênio do aspartato e de um grupo formila, seguida de fechamento do anel, produz o inosinato, um ribonucleotídio purínico. O AMP e o GMP são formados a partir do IMP. Os ribonucleotídios purínicos também podem ser sintetizados por uma via de recuperação, em que uma base pré-formada reage diretamente com PRPP.

25.3 Os desoxirribonucleotídios são sintetizados pela redução de ribonucleotídios por meio de um mecanismo de formação de radicais livres

Os desoxirribonucleotídios, os precursores do DNA, são formados em *E. coli*, pela redução de ribonucleosídio difosfatos. Essas conversões são catalisadas pela ribonucleotídio redutase. Ocorre transferência de elétrons do NADPH para grupos sulfidrila nos sítios ativos dessa enzima pela tiorredoxina. Um radical livre tirosila, produzido por um centro de ferro na redutase, inicia uma reação de radicais no açúcar, levando à troca de H por OH em C-2 . O TMP é formado por metilação de dUMP. O doador de um grupo metileno e um hidreto nessa reação é o N^5, N^{10}-metileno tetra-hidrofolato, que é convertido em di-hidrofolato. O tetra-hidrofolato é regenerado pela redução do di-hidrofolato pelo NADPH. A di-hidrofolato redutase, que catalisa essa reação, é inibida por análogos do folato, como a aminopterina e o metotrexato. Esses compostos e a fluorouracila, um inibidor da timidilato sintase, são usados como agentes antineoplásicos.

25.4 As etapas essenciais na biossíntese de nucleotídios são reguladas por inibição por retroalimentação

A biossíntese de pirimidinas em *E. coli* é regulada pela inibição por retroalimentação da aspartato transcarbamoilase, a enzima que catalisa a etapa comprometida. A CTP inibe essa enzima enquanto o ATP a estimula. A inibição por retroalimentação da glutamina-PRPP amidotransferase por nucleotídios purínicos é importante na regulação de sua biossíntese.

25.5 Os distúrbios no metabolismo de nucleotídios podem causar condições patológicas

A imunodeficiência combinada grave resulta da ausência de adenosina desaminase, uma enzima da via de degradação das purinas. As purinas são degradadas a urato nos seres humanos. A gota, uma doença que acomete as articulações e leva ao desenvolvimento de artrite, está associada ao acúmulo excessivo de urato. A síndrome de Lesch-Nyhan, uma doença genética caracterizada por automutilação, deficiência mental e gota, é causada pela ausência de hipoxantina guanina fosforribosil transferase. Essa enzima é essencial para a síntese de nucleotídios purínicos pela via de recuperação. Os defeitos do tubo neural são mais frequentes quando uma mulher grávida tem deficiência de derivados do folato no início da gestação, possivelmente devido ao papel importante desempenhado por esses derivados na síntese de precursores do DNA.

Palavras-chave

5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) (p. 744)
carbamoil fosfato sintetase (CPS) (p. 743)
defeito do tubo neural (p. 761)
di-hidrofolato redutase (p. 755)
enovelamento do tipo *ATP grasp* (p. 743)
espinha bífida (p. 761)
glutamina fosforribosil amidotransferase (p. 747)
gota (p. 759)
imunodeficiência combinada grave (IDCG) (p. 759)
nucleotídio pirimidínico (p. 742)

nucleotídio purínico (p. 746)
orotidilato (p. 745)
ribonucleotídio redutase (p. 751)
síndrome de Lesch-Nyhan (p. 760)
timidilato sintase (p. 754)
via de recuperação (p. 746)

Questões

1. *Reinicie ou separe, guarde e reutilize*. Diferencie a síntese *de novo* dos nucleotídios da síntese pela via de recuperação.

2. *Encontrando suas raízes 1*. Identifique a fonte dos átomos no anel pirimidina.

3. *Encontrando suas raízes 2*. Identifique a fonte dos átomos no anel de purina.

4. *Multifacetados*. Cite alguns dos papéis bioquímicos desempenhados pelos nucleotídios.

5. *S* em lugar de *t*? Diferencie um nucleosídio de um nucleotídio.

6. *Faça a associação correta*.

(a) Urato em excesso
(b) Ausência de adenosina desaminase
(c) Ausência de HGPRT
(d) Carbamoil fosfato
(e) Inosinato
(f) Ribonucleotídio redutase
(g) Ausência de ácido fólico
(h) Glutamina fosforribosil transferase
(i) Anel simples
(j) Anel bicíclico
(k) Precursor de CTP

1. Espinha bífida
2. Precursor de ATP e GTP
3. Purina
4. Síntese de desoxinucleotídios
5. UTP
6. Doença de Lesch-Nyhan
7. Imunodeficiência
8. Pirimidina

9. Gota

10. Primeira etapa na síntese de pirimidinas

11. Etapa comprometida na síntese de purina

7. *Passagem segura*. O que é canalização de substrato? Como afeta a eficiência da enzima?

8. *Ribose fosfato ativada*. Escreva uma equação balanceada para a síntese de PRPP a partir da glicose através do ramo oxidativo da via das pentoses fosfato.

9. *Fazendo uma pirimidina*. Escreva uma equação balanceada para a síntese do orotato a partir da glutamina, CO_2 e aspartato.

10. *Identificando o doador*. Qual é o reagente ativado na biossíntese de cada um desses compostos?

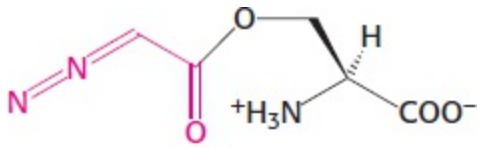
(a) Fosforribosilamina

(b) Carbamoil aspartato

(c) Orotidilato (a partir do orotato)

(d) Fosforribosil antranilato

11. *Inibindo a biossíntese de purinas*. As amidotransferases são inibidas pelo antibiótico azasserina (*O*-diazoacetil-L-serina), que é um análogo da glutamina.

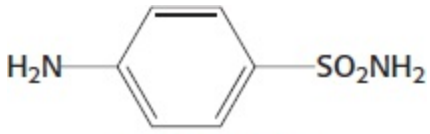


Azasserina

Que intermediários na biossíntese de purinas se acumulariam em células tratadas com azasserina?

12. *O preço da metilação*. Escreva uma equação balanceada para a síntese de TMP a partir de dUMP, acoplada à conversão da serina em glicina.

13. *Ação da sulfa*. O crescimento bacteriano é inibido pela sulfanilamida e sulfas relacionadas, e observa-se acúmulo concomitante de 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídio. Essa inibição é revertida pela inibição de *p*-aminobenzoato.



Sulfanilamida

Proponha um mecanismo para o efeito inibidor da sulfanilamida.

14. *Meio HAT.* As células mutantes incapazes de sintetizar nucleotídios pelas vias de recuperação constituem instrumentos de grande utilidade na biologia molecular e celular. Suponha que a célula A careça de timidina quinase, a enzima que catalisa a fosforilação de timidina a timidilato, e que a célula B careça de hipoxantina-guanina fosforribosil transferase.

(a) As células A e B não proliferam em meio HAT contendo *h*ipoxantina, *a*minopterina ou

*a*metopterina (metotrexato) e *t*imina. Entretanto, a célula C, formada pela fusão das células A e B, cresce no meio. Por quê?

(b) Suponha que você queira introduzir genes exógenos na célula A. Planeje um modo simples de distinguir entre as células que captaram o DNA exógeno e as que não o captaram.

15. *Estabelecendo o equilíbrio*. Qual a relação de substrato recíproco na síntese de ATP e GTP?

16. *Encontrando o marcador*. Suponha que células estejam crescendo na presença de aminoácidos que foram marcados nos carbonos α com ^{13}C. Identifique os átomos na citosina e na guanina que estarão marcados com ^{13}C.

17. *Cursos diferentes*. Os seres humanos contêm duas carbamoil fosfato sintetase diferentes. Uma delas utiliza glutamina como substrato, enquanto a outra usa amônia. Quais as funções dessas duas enzimas?

18. *Terapia adjuvante*. O alopurinol é algumas vezes administrado a pacientes com leucemia aguda que estão sendo tratados com agentes antineoplásico. Por que se utiliza o alopurinol?

19. *Uma enzima manca*. Ambos os átomos de oxigênio da cadeia lateral do aspartato 27 do sítio ativo da di-hidrofolato redutase formam pontes de hidrogênio com o anel de pteridina de folatos. A importância dessa interação foi avaliada pelo estudo de dois mutantes nessa posição, Asn 27 e Ser 27. A constante de dissociação do metotrexato foi de 0,07 nM para o tipo selvagem, de 1,9 nM para o mutante Asn 27 e 210 nM para o mutante Ser 27 a 25°C. Calcule a energia livre padrão da ligação do metotrexato por essas três proteínas. Qual a diminuição da energia de ligação resultante de cada mutação?

20. *Corrigindo deficiências.* Suponha que seja encontrada uma pessoa com deficiência de enzima necessária para a síntese de IMP. Como essa pessoa poderia ser tratada?

21. *Nitrogênio marcado*. A biossíntese de purinas ocorre na presença de [^{15}N] aspartato, e o GTP e ATP recém-sintetizados são isolados. Que posições estão marcadas nos dois nucleotídios?

22. *Na pista de carbonos*. Células em cultura tecidual foram incubadas com glutamina marcada com ^{15}N no grupo amida. Subsequentemente, foi isolado o IMP, e verificou-se que ele contém algum ^{15}N. Que átomos no IMP estavam marcados?

23. *Mecanismo de ação*. Qual a base bioquímica do tratamento da gota com alopurinol?

24. *Inibidor alterado*. A xantinoxidase tratada com alopurinol resulta na formação de um novo composto que é um inibidor extremamente potente da enzima. Proponha uma estrutura para esse composto.

25. *Calcule a pegada do ATP*. Quantas moléculas de ATP são necessárias para sintetizar uma molécula de CTP a partir do início?

26. *Bloqueios*. Que intermediário na síntese de purinas irá se acumular se uma cepa de bactérias estiver com falta de cada uma das seguintes substâncias bioquímicas?

(a) Aspartato

(b) Tetra-hidrofolato

(c) Glicina

(d) Glutamina

Questões sobre mecanismo

27. *O mesmo, e não o mesmo*. Escreva mecanismos para conversão da fosforribosilamina em glicinamida ribonucleotídio e do xantilato em guanilato.

28. *Fechando o anel*. Proponha um mecanismo para a conversão de 5-formamidoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídio em inosinato.

Questões Integração de capítulos

29. *Um doador generoso*. Quais as principais reações de biossíntese que utilizam o PRPP?

30. *Estão por toda parte!* Os nucleotídios desempenham uma variedade de papéis na célula. Cite um exemplo de nucleotídio que atue em cada uma das seguintes funções ou processos.

(a) Segundo mensageiro

(b) Transferência de grupo fosforila

(c) Ativação de carboidratos

(d) Ativação de grupos acetila

(e) Transferência de elétrons

(f) Sequenciamento do DNA

(g) Quimioterapia

(h) Efetor alostérico

31. *Anemia perniciosa*. A biossíntese de purinas é prejudicada pela deficiência de vitamina B_{12}. Por quê? Como o metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos também poderia ser afetado por uma deficiência de vitamina B_{12}?

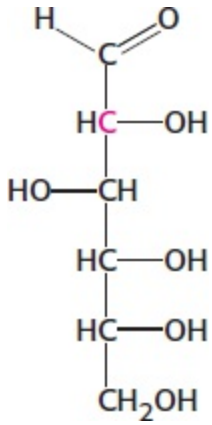
32. *Deficiência de folato*. Suponha que alguém esteja com deficiência de folato. Que células, você acredita, poderiam estar mais afetadas? Os sintomas podem incluir diarreia e anemia.

33. *Hiperuricemia*. Muitos pacientes com deficiência de glicose 6-fosfatase apresentam níveis séricos elevados de urato. A hiperuricemia pode ser induzida em indivíduos normais pela ingestão de álcool ou por exercício físico vigoroso. Proponha um mecanismo comum responsável por esses achados.

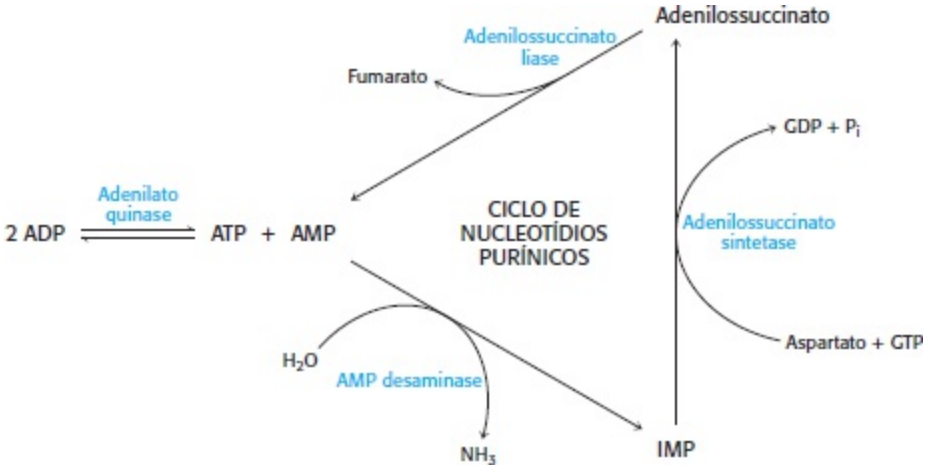
34. *Carbono marcado*. O succinato uniformemente marcado com ^{14}C é acrescentado a células ativamente envolvidas na biossíntese de pirimidinas. Proponha um mecanismo pelo qual os átomos de carbono do succinato possam ser incorporados a uma pirimidina. Em que posições a pirimidina estará marcada?

35. *Algo estranho está acontecendo aqui*. Foram incubadas células com glicose marcada com ^{14}C no carbono 2, que aparece em vermelho na parte superior da estrutura apresentada. Posteriormente, a uracila foi isolada, e foi constatado que continha ^{14}C nos carbonos 4 e 6. Explique esse padrão de

marcação.



36. *Músculo em atividade*. Algumas reações interessantes ocorrem no tecido muscular para facilitar a produção de ATP para a contração.



Na contração muscular, o ATP é convertido em ADP. A adenilato quinase converte duas moléculas de ADP em uma molécula de ATP e outra de AMP.

(a) Por que essa reação é benéfica para a contração muscular?

(b) Por que o equilíbrio para a adenilato quinase é aproximadamente igual a 1?

O músculo pode metabolizar o AMP utilizando o ciclo de nucleotídios purínicos. A etapa inicial desse ciclo, que é catalisada pela AMP desaminase, é a conversão do AMP em IMP.

(c) Por que a desaminação do AMP facilitaria a formação de ATP no músculo?

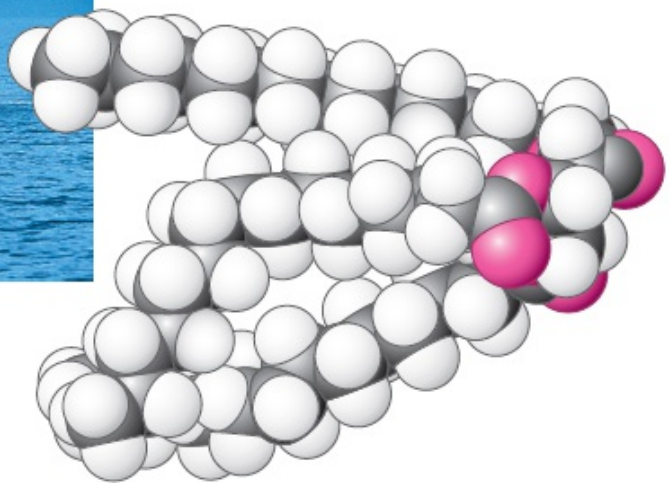
(d) Como o ciclo de nucleotídios purínicos ajuda na produção aeróbica de ATP?

37. *Uma etapa comum*. Quais as três reações que transferem um grupo amino do aspartato para produzir o produto aminado e fumarato?

38. *Seu pato de estimação*. Você suspeita que o seu pato de estimação esteja com gota. Por que você pensaria duas vezes antes de administrar uma dose de alopurinol misturada com pão?

Biossíntese dos Lipídios e Esteroides da Membrana

26



As gorduras, como a molécula de triacilglicerol (abaixo), são amplamente utilizadas para armazenar o excesso de energia para uso posterior e para atender a outros propósitos, como é o caso da gordura isolante das baleias. A tendência natural das gorduras de assumir formas quase desprovidas de água faz com que essas moléculas se adaptem bem a essas funções. [Fotografia à esquerda, de François Cohier/Photo Researchers.]

SUMÁRIO

26.1 O fosfatidato é um intermediário comum na síntese dos fosfolipídios e triacilgliceróis

26.2 O colesterol é sintetizado a partir da acetil-coenzima A em três estágios

26.3 A regulação complexa da biossíntese de colesterol ocorre em vários níveis

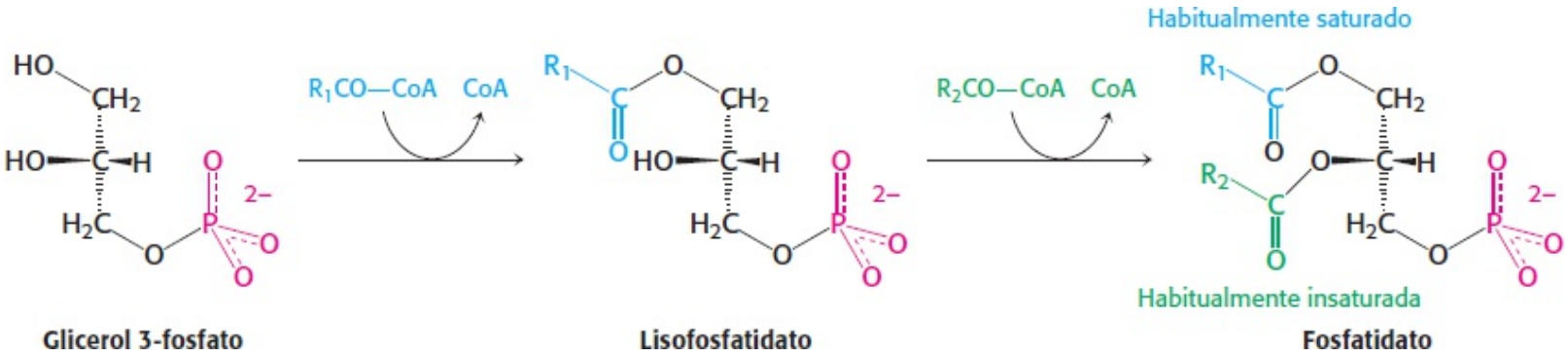
26.4 Os derivados importantes do colesterol incluem sais biliares e hormônios esteroides

Neste capítulo analisaremos a biossíntese de três componentes importantes das membranas biológicas – os fosfolipídios e os esfingolipídios, e o colesterol (Capítulo 12). Os triacilgliceróis também serão considerados aqui, visto que a via de sua síntese se superpõe àquela dos fosfolipídios. O colesterol é importante não apenas como componente de membrana, mas também como precursor de muitas moléculas de sinalização, incluindo os hormônios esteroides progesterona, testosterona, estrogênio e cortisol.

O transporte e a captação do colesterol ilustram de maneira brilhante um mecanismo recorrente de entrada de metabólitos e de moléculas de sinalização nas células. O colesterol é transportado no sangue pela lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês *low-density lipoprotein*) e captado no interior das células pelo receptor de LDL presente na superfície celular. O receptor de LDL está ausente em indivíduos com *hipercolesterolemia familiar,* uma doença genética. As pessoas que carecem desse receptor apresentam níveis acentuadamente elevados de colesterol no sangue e depósitos de colesterol nos vasos sanguíneos e têm predisposição a sofrer ataques cardíacos na infância. Com efeito, o colesterol está implicado no desenvolvimento de aterosclerose em indivíduos que não apresentam defeitos genéticos. Por conseguinte, a regulação da síntese e do transporte do colesterol pode constituir uma fonte de esclarecimentos particularmente bem definidos sobre o papel que a compreensão da bioquímica desempenha na medicina.

26.1 O fosfatidato é um intermediário comum na síntese dos fosfolipídios e triacilgliceróis

A síntese de lipídios exige a ação coordenada da gliconeogênese e do metabolismo dos ácidos graxos, conforme ilustrado na Figura 26.1. A primeira etapa na síntese dos fosfolipídios de membranas e dos triacilgliceróis para o armazenamento de energia consiste na síntese de *fosfatidato* (diacilglicerol 3-fosfato). Nas células dos mamíferos, o fosfatidato é sintetizado no retículo endoplasmático e na membrana mitocondrial externa. A via começa com o *glicerol 3-fosfato,* que é formado principalmente pela redução da di-hidroacetona fosfato (DHAP) sintetizada pela via gliconeogênica e, em menor grau, pela fosforilação do glicerol. A adição de dois ácidos graxos ao glicerol 3-fosfato produz o fosfatidato. Em primeiro lugar, a acil-coenzima A contribui com uma cadeia de ácido graxo para formar *lisofosfatidato,* e, em seguida, uma segunda acil-CoA contribui com uma cadeia de ácido graxo, produzindo o fosfatidato.



Essas acilações são catalisadas pela *glicerol fosfato aciltransferase.* Na maioria dos fosfatidatos, a cadeia de ácido graxo ligada ao átomo de C-1 é saturada, enquanto a cadeia fixada ao átomo de C-2 é insaturada. O fosfatidato também pode ser sintetizado a partir do diacilglicerol, em uma via essencialmente de recuperação, pela ação da *diacilglicerol quinase:*

$$\text{Diacilglicerol} + \text{ATP} \rightarrow \text{fosfatidato} + \text{ADP}$$

As vias dos fosfolipídios e dos triacilgliceróis divergem a partir do fosfatidato. Na síntese de triacilgliceróis, uma enzima-chave na regulação da síntese de lipídios, a *ácido fosfatídico fosfatase,* hidrolisa o fosfatidato, produzindo um *diacilglicerol* (DAG). Esse intermediário é acilado a um

triacilglicerol por meio da adição de uma terceira cadeia de ácido graxo, em uma reação catalisada pela *diglicerídio aciltransferase.* Ambas as enzimas estão associadas em um *complexo de triacilglicerol sintetase,* que está ligado à membrana do retículo endoplasmático.

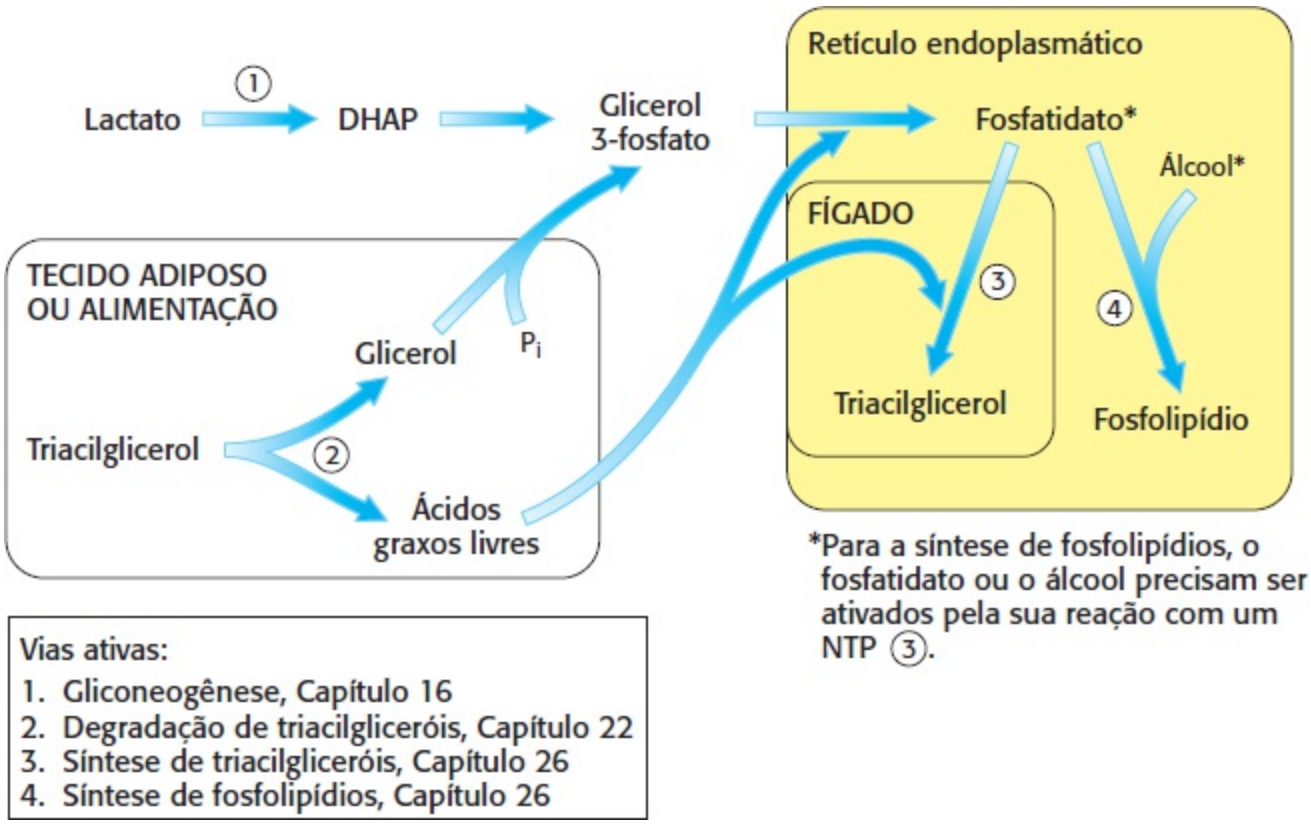
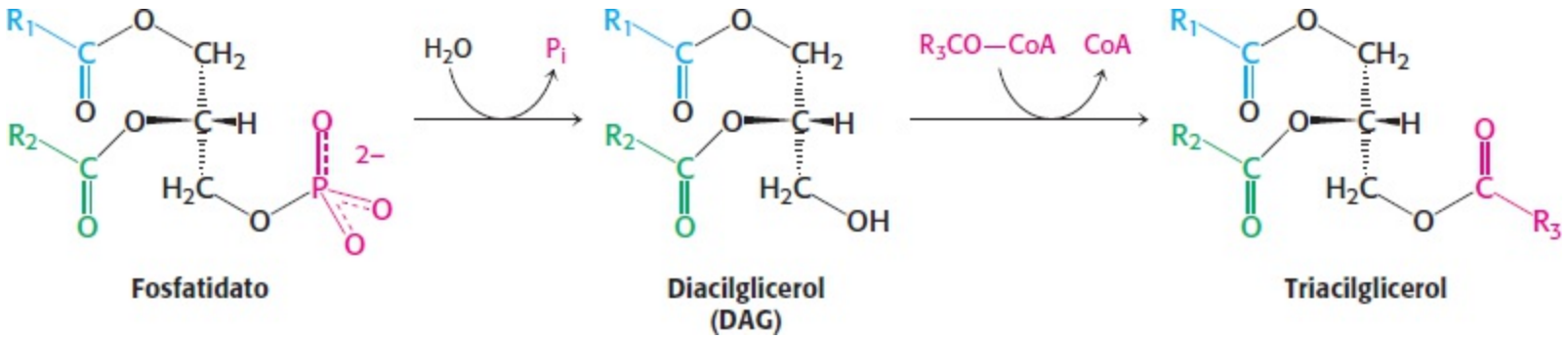


Figura 26.1 Integração de vias: fontes de intermediários na síntese de triacilgliceróis e fosfolipídios. O fosfatidato, que é sintetizado a partir da di-hidroxiacetona fosfato (DHAP) produzida na gliconeogênese, e ácidos graxos podem ser processados subsequentemente, produzindo triacilglicerol ou fosfolipídios. Os fosfolipídios e outros lipídios de membrana são continuamente produzidos em todas as células.



O fígado é o principal local de síntese de triacilgliceróis. A partir do fígado, os triacilgliceróis são transportados até os músculos para conversão em energia ou para o seu armazenamento nas células adiposas.

A síntese de fosfolipídios exige um intermediário ativado

A síntese de lipídios da membrana prossegue no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi. A síntese de *fosfolipídios* requer a combinação de um diacilglicerol com um álcool. Como na maioria das reações anabólicas, um dos componentes precisa ser ativado. Nesse caso, o diacilglicerol ou o álcool podem ser ativados, dependendo da fonte dos reagentes.

Síntese a partir de um diacilglicerol ativado. A via *de novo* começa com a reação do fosfatidato com a citidina trifosfato (CTP), formando o diacilglicerol ativado, a *citidina difosfodiacilglicerol* (CDP-diacilglicerol; Figura 26.2). Essa reação, como muitas das que ocorrem em processos de biossíntese, é impulsionada pela hidrólise do pirofosfato.

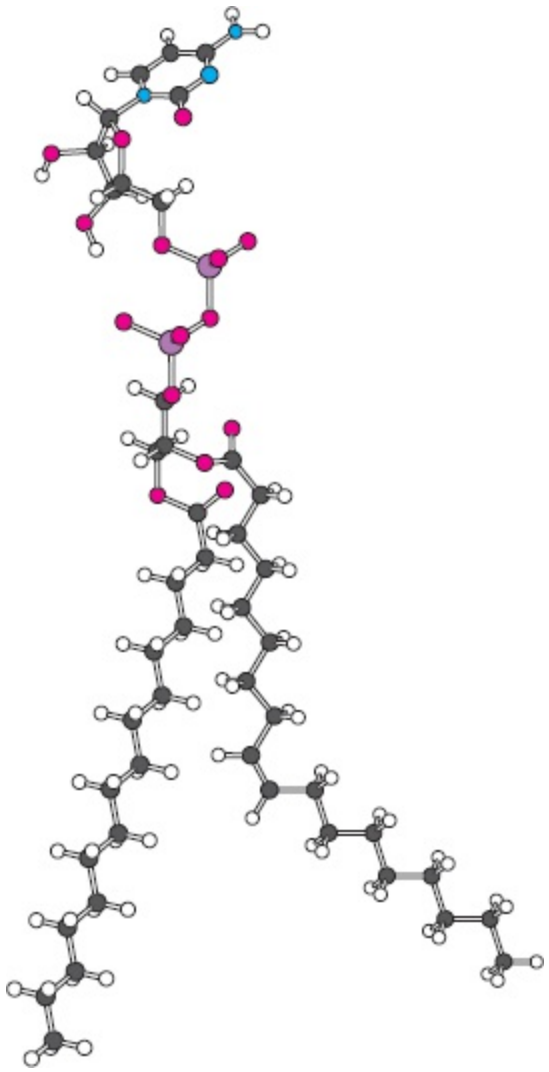
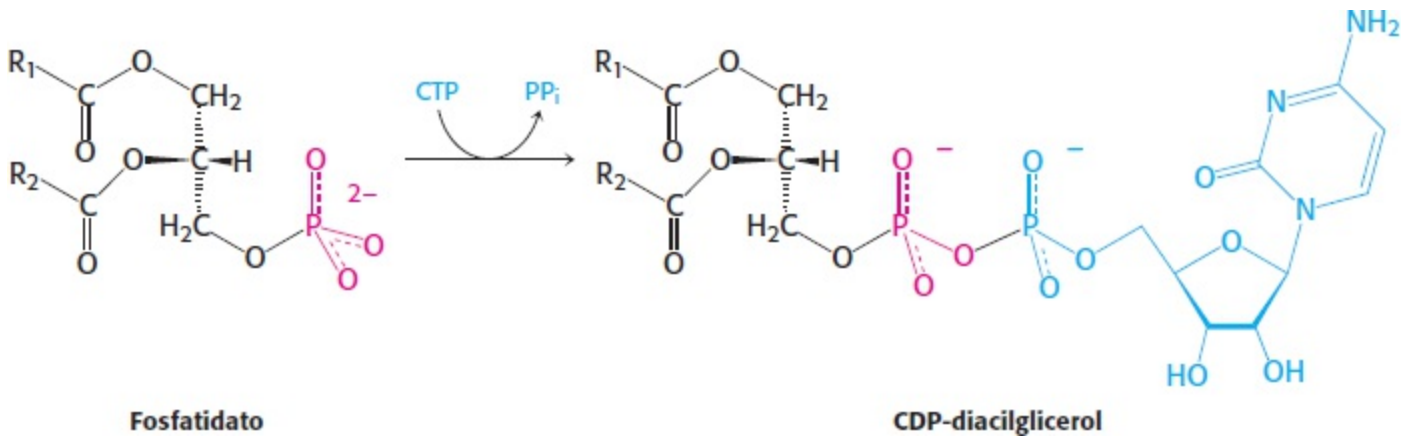
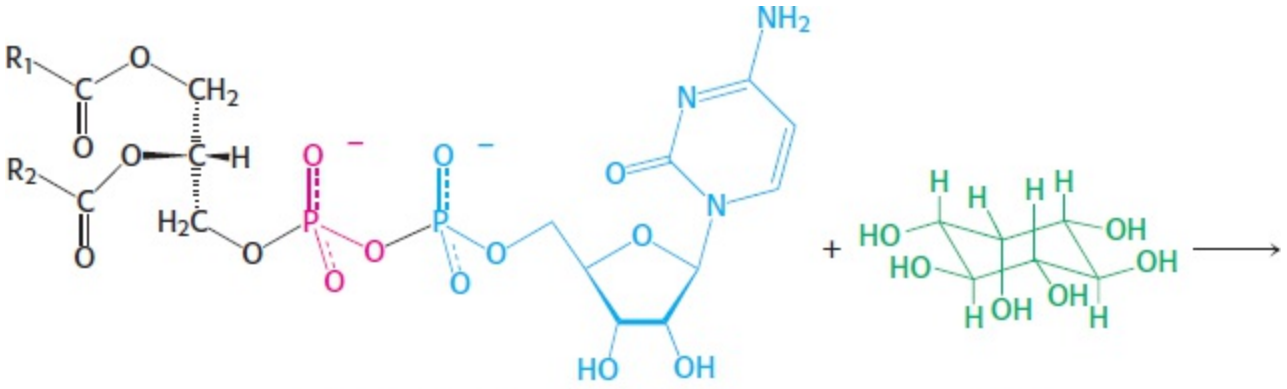
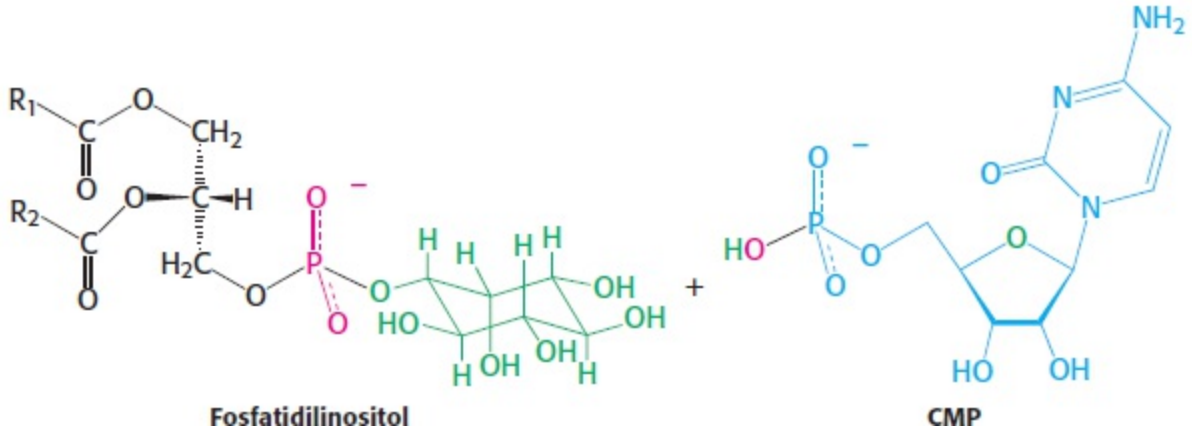


Figura 26.2 Estrutura da CDP-diacilglicerol. Um intermediário-chave na síntese de fosfolipídios consiste no fosfatidato e citidina monofosfato ligados por uma ligação pirofosfato.

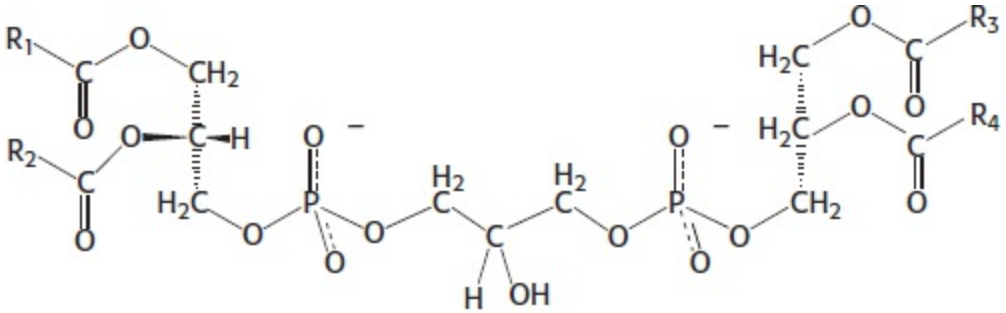


Em seguida, a unidade fosfatidil ativada reage com o grupo hidroxila de um álcool, formando uma ligação fosfodiéster. Se o álcool for inositol, os produtos serão o *fosfatidilinositol* e a citidina monofosfato (CMP).

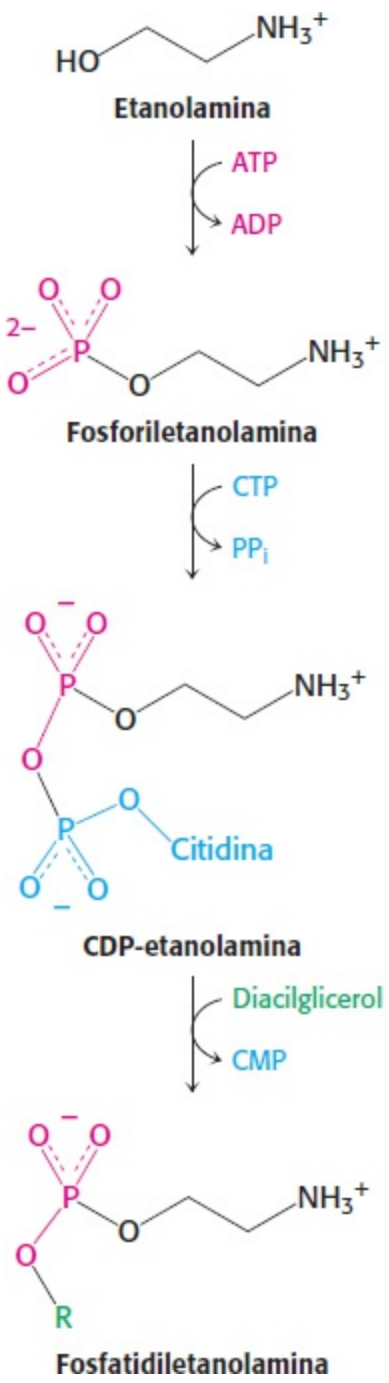




Fosforilações subsequentes, catalisadas por quinases específicas, levam à síntese de *fosfatidilinositol 4,5-bifosfato*, o precursor de dois mensageiros intracelulares – o diacilglicerol e o inositol 1,4,5-trifosfato (Seção 14.2). Se o álcool for o fosfatidilglicerol, os produtos serão o difosfatidilglicerol (cardiolipina) e a CMP. Nos eucariotos, a cardiolipina localiza-se exclusivamente na membrana mitocondrial interna e desempenha um importante papel na organização dos componentes proteicos da fosforilação oxidativa. Por exemplo, a cardiolipina é necessária para a atividade integral da citocromo oxidase.

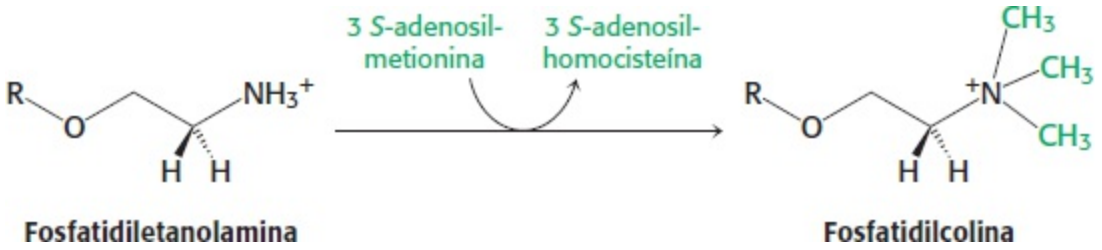


Os componentes de ácidos graxos dos fosfolipídios podem variar; por conseguinte, a cardiolipina, bem como a maioria dos outros fosfolipídios, representa uma classe de moléculas, e não uma única espécie. Em consequência, uma única célula de mamífero pode conter milhares de fosfolipídios distintos. O fosfatidilinositol é incomum, visto que apresenta uma composição quase fixa de ácidos graxos. Em geral, o ácido esteárico ocupa a posição C-1, e o ácido araquidônico, a posição C-2.



Síntese a partir de um álcool ativado. A fosfatidiletanolamina, o principal fosfolipídio do folheto interno das membranas celulares, é sintetizada a partir do álcool etanolamina. Para ativar o álcool, a etanolamina é fosforilada pelo ATP, formando o precursor *fosforiletanolamina*. Em seguida, esse precursor reage com CTP, produzindo o álcool ativado, a *CDP-etanolamina*. A unidade de fosforiletanolamina da CDP-etanolamina é transferida para um diacilglicerol para formar a *fosfatidiletanolamina*.

Nos mamíferos, o fosfolipídio mais comum é a fosfatidilcolina. Nesse caso, a colina da alimentação é ativada em uma série de reações análogas àquelas da ativação da etanolamina. É interessante ressaltar que o fígado possui uma enzima, a *fosfatidiletanolamina metiltransferase*, que sintetiza a fosfatidilcolina a partir da fosfatidiletanolamina quando a colina da alimentação é insuficiente. O grupo amino dessa fosfatidiletanolamina é metilado três vezes para formar a *fosfatidilcolina*. A S-*adenosilmetionina* é o doador de metila.



Por conseguinte, nos mamíferos, a fosfatidilcolina pode ser produzida por duas vias distintas, assegurando, assim, a síntese desse fosfolipídio mesmo se houver suprimento limitado dos componentes de uma das vias.

A fosfatidilserina constitui 10% dos fosfolipídios dos mamíferos. Esse fosfolipídio é sintetizado em uma *reação de troca de bases* da serina com a fosfatidilcolina ou a fosfatidiletanolamina. Na reação, a serina substitui a colina ou a etanolamina.

Fosfatidilcolina + serina → colina + fosfatidilserina

Fosfatidiletanolamina + serina → etanolamina + fosfatidilserina

A fosfatidilserina está normalmente localizada no folheto interno da bicamada da membrana plasmática, porém é deslocada para o folheto externo na apoptose (Seção 18.6). Nesse local, pode atuar para que os fagócitos atraídos consumam os remanescentes celulares após a finalização do processo de apoptose.

Observe que um nucleotídio de citidina desempenha o mesmo papel na síntese desses fosfoglicerídios do que o nucleotídio de uridina na formação do glicogênio (Seção 21.4). Em todos esses processos de biossíntese, ocorre formação de um intermediário ativado (UDP-glicose, CDP-diacilglicerol ou CDP-álcool) a partir de um substrato fosforilado (glicose 1-fosfato, fosfatidato ou fosforil álcool) e de um nucleosídio trifosfato (UTP ou CTP). Em seguida, o intermediário ativado reage com o grupo hidroxila (a terminação do glicogênio, a cadeia lateral da serina ou um diacilglicerol).

Os esfingolipídios são sintetizados a partir da ceramida

Uma vez discutidos os fosfolipídios à base de glicerol, analisemos outra classe de lipídios de membrana – os *esfingolipídios*. Esses lipídios são encontrados nas membranas plasmáticas de todas as células eucarióticas, embora a concentração seja maior nas células do sistema nervoso central. A estrutura de um esfingolipídio é a *esfingosina*, em lugar do glicerol. A palmitoil-CoA e a serina condensam-se para formar a 3-cetoesfinganina. A serina-palmitoiltransferase, que catalisa essa reação, é a etapa limitante da velocidade da via e exige a presença de piridoxal fosfato, revelando mais uma vez o papel dominante desse cofator em transformações que incluem aminoácidos. Em seguida, a cetoesfinganina é reduzida a di-hidroesfingosina antes de sua conversão em *ceramida*, um lipídio constituído de uma cadeia de ácidos graxos ligada ao grupo amino de um arcabouço de esfingosina (Figura 26.3).

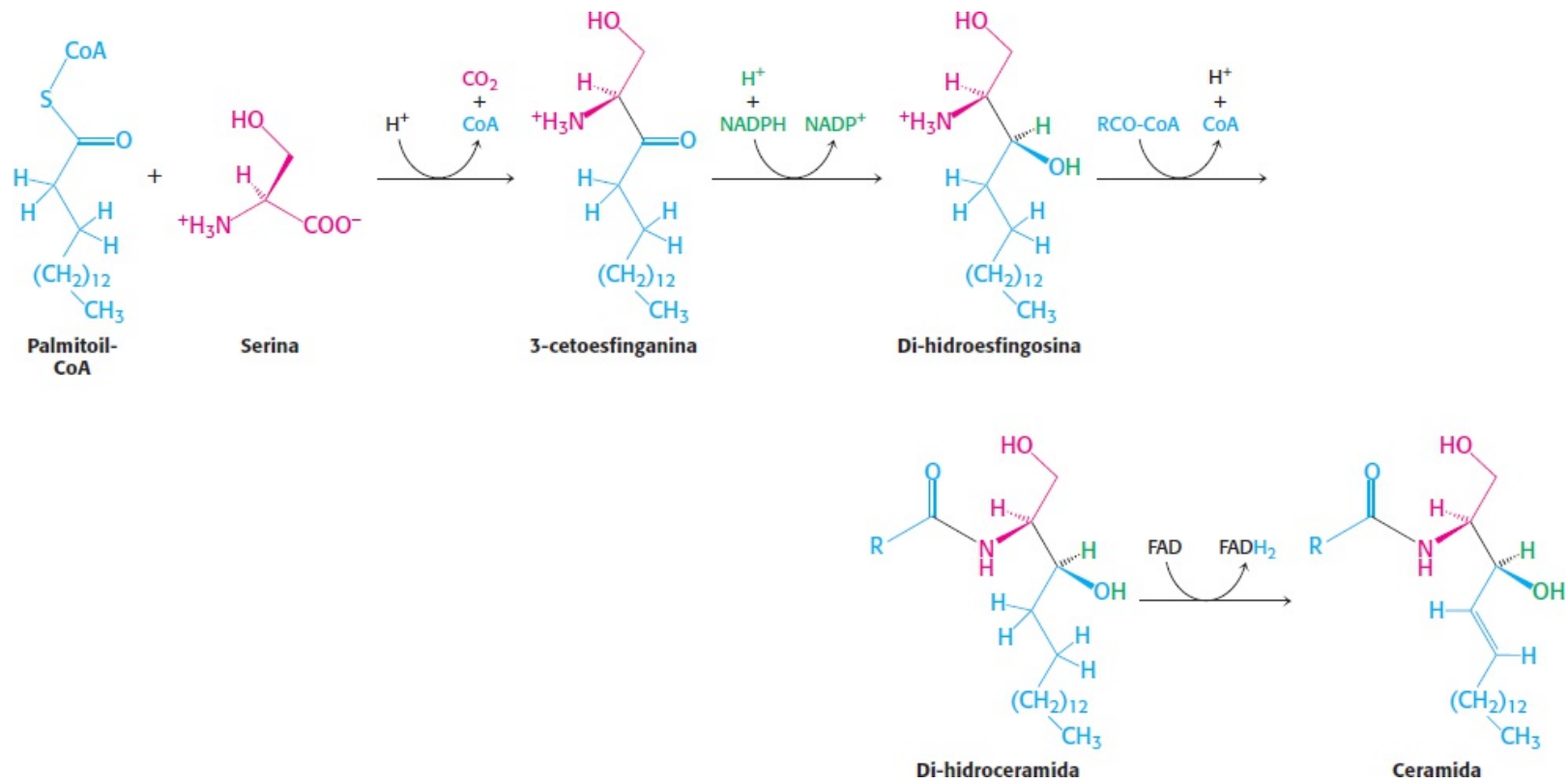
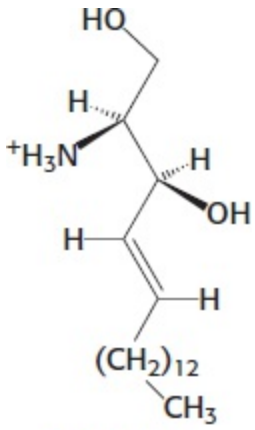


Figura 26.3 Síntese de ceramida. A palmitoil-CoA e a serina combinam-se para iniciar a síntese da ceramida.

Em todos os esfingolipídios, o grupo amino da ceramida é acilado (Figura 26.4). O grupo hidroxila terminal também é substituído. Na *esfingomielina*, um componente da bainha de mielina que reveste muitas fibras nervosas, o substituinte é a fosforilcolina, que provém da fosfatidilcolina. Em um *cerebrosídio*, o substituinte é a glicose ou galactose. O doador de açúcar consiste em UDP-glicose ou UDP-galactose.



Os gangliosídios são esfingolipídios ricos em carboidratos que contêm açúcares ácidos

Os gangliosídios são os esfingolipídios mais complexos. Em um *gangliosídio*, uma *cadeia de oligossacarídio* é ligada ao grupo hidroxila terminal da ceramida por um resíduo de glicose (Figura 26.5). Essa cadeia oligossacarídica contém pelo menos um açúcar ácido, o N-*acetilneuraminato* ou o N-*glicolilneuraminato*. Esses açúcares ácidos são denominados *ácidos siálicos*. Seus esqueletos de nove carbonos são sintetizados a partir do fosfoenolpiruvato (uma unidade de três carbonos) e *N*-acetilmanosamina 6-fosfato (uma unidade de seis carbonos).

Os gangliosídios são sintetizados pela adição ordenada e sequencial de resíduos de açúcar à ceramida. A síntese desses lipídios complexos exige a presença dos açúcares ativados UDP-glicose, UDP-galactose e UDP-*N*-acetilgalactosamina, bem como o derivado CMP do *N*-acetilneuraminato. O CMP-*N*-acetilneuraminato é sintetizado a partir de CTP e *N*-acetilneuraminato. A composição de açúcares do gangliosídio resultante é determinada pela especificidade das glicosiltransferases na célula. Foram caracterizados mais de 60 gangliosídios diferentes (ver a Figura 26.5 para a composição do gangliosídio G_{M1}). A ligação de gangliosídio pela toxina do cólera constitui a primeira etapa no desenvolvimento do cólera, uma afecção patológica caracterizada por diarreia grave. Os gangliosídios também são cruciais para a ligação das células do sistema imune aos locais de lesão na resposta inflamatória.

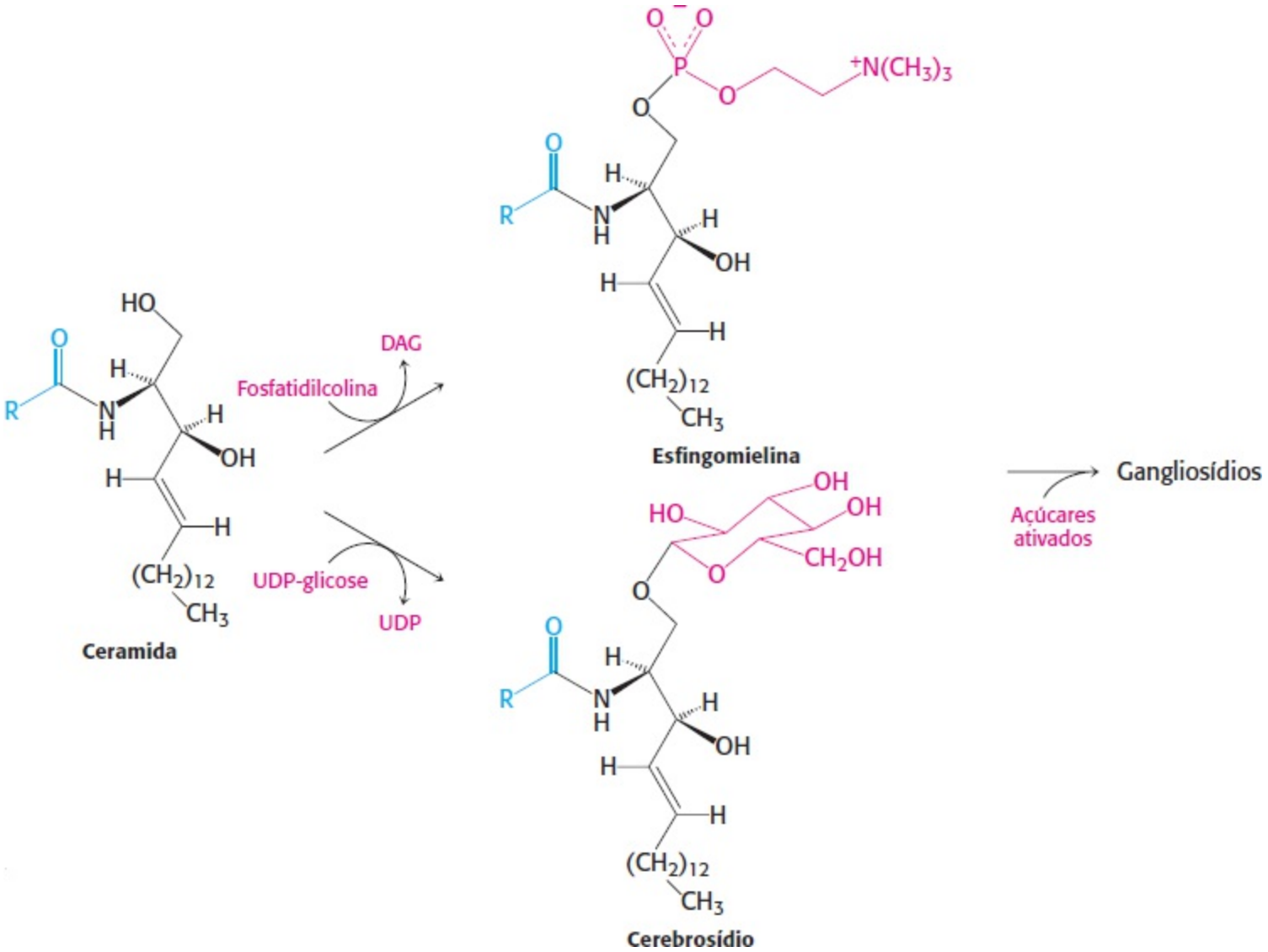


Figura 26.4 Síntese de esfingolipídios. A ceramida constitui o ponto de partida para a formação da esfingomielina e dos gangliosídios.

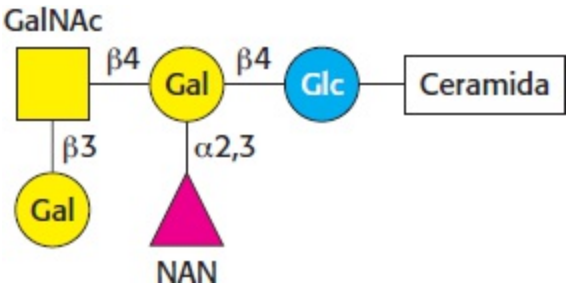
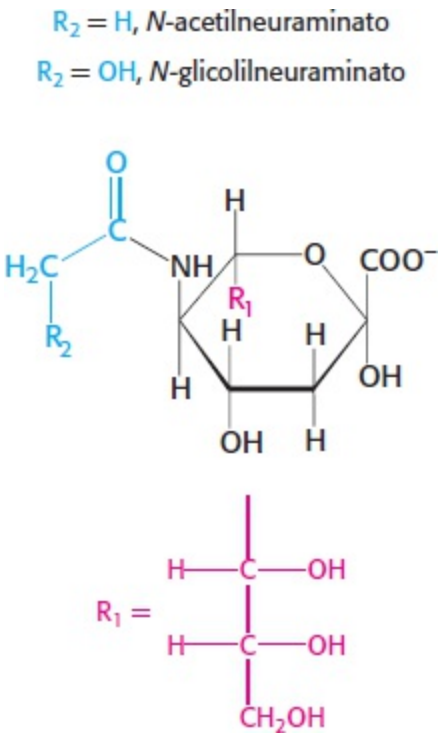


Figura 26.5 Gangliosídio G_{M1}. Este gangliosídio é constituído de cinco monossacarídios ligados à ceramida: uma molécula de glicose (Glc), duas moléculas de galactose (Gal), uma molécula de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) e uma molécula de *N*-acetilneuraminato (NAN).

Os esfingolipídios conferem diversidade à estrutura e função dos lipídios

As estruturas dos esfingolipídios e dos glicerofosfolipídios mais abundantes são muito semelhantes. Considerando a semelhança estrutural desses dois tipos de lipídios, por que os esfingolipídios são necessários? Na verdade, o prefixo "esfingo" foi aplicado para captar as características enigmáticas "semelhantes à esfinge" dessa classe de lipídios. Embora o papel exato dos esfingolipídios não esteja firmemente estabelecido, o enigma de sua função está, aos poucos, sendo desvendado. Conforme discutido no Capítulo 12, os esfingolipídios são componentes importantes das balsas lipídicas (*lipid rafts*), que consistem em regiões altamente organizadas da membrana plasmática importantes na transdução de sinais. A esfingosina, a esfingosina 1-fosfato e a ceramida atuam como segundos mensageiros na regulação do crescimento, da diferenciação e da morte celular. Por exemplo, a ceramida que se origina de um esfingolipídio inicia o processo de morte celular programada em alguns tipos de células e pode contribuir para o desenvolvimento do diabetes melito tipo 2 (Capítulo 27).



A síndrome de angústia respiratória e a doença de Tay-Sachs resultam de uma perturbação no metabolismo dos lipídios

A *síndrome de angústia respiratória* é uma condição patológica que resulta de uma falha na via de biossíntese da dipalmitoil fosfatidilcolina. Esse fosfolipídio, juntamente com proteínas específicas e outros fosfolipídios, é encontrado no líquido extracelular que circunda os alvéolos dos pulmões. Sua função consiste em diminuir a tensão superficial desse líquido, a fim de impedir o colapso do pulmão no final da fase expiratória da respiração. Os recém-nascidos prematuros podem sofrer de síndrome de angústia respiratória, visto que seus pulmões imaturos não sintetizam quantidades suficientes de dipalmitoil fosfatidilcolina.

A *doença de Tay-Sachs* é causada por um defeito da degradação dos lipídios: a incapacidade de degradar gangliosídios. Os gangliosídios são encontrados em maior concentração no sistema nervoso, particularmente na substância cinzenta, onde constituem 6% dos lipídios. Os gangliosídios são normalmente degradados no interior dos lisossomos pela remoção sequencial de seus açúcares terminais; entretanto, na doença de Tay-Sachs, essa degradação não ocorre. Em consequência, os neurônios ficam significativamente aumentados, com lisossomos repletos de lipídios (Figura 26.6). Um lactente acometido apresenta fraqueza e retardo das habilidades psicomotoras antes de 1 ano de idade. A criança desenvolve demência e cegueira em torno dos 2 anos de idade e morre habitualmente antes dos 3 anos.

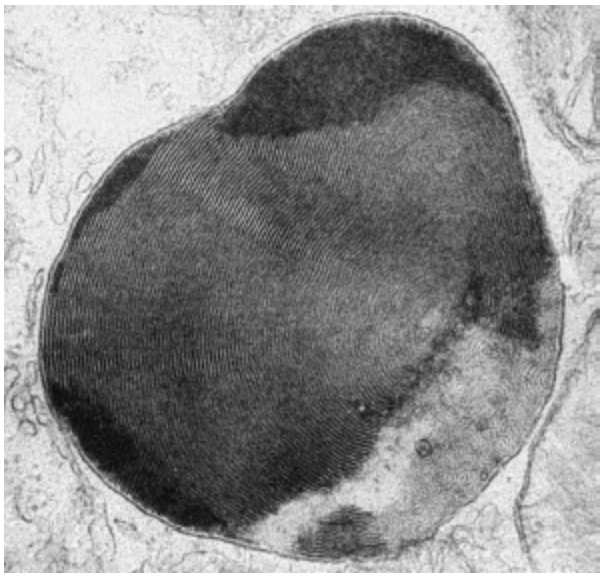
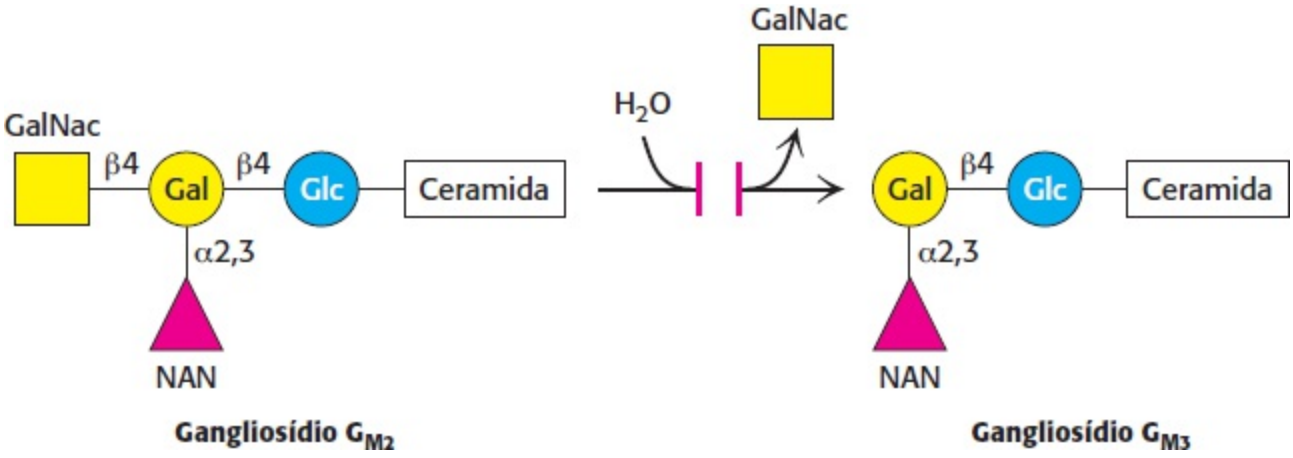


Figura 26.6 Lisossomo com lipídios. Micrografia eletrônica de um lisossomo contendo uma quantidade anormal de lipídios. [Cortesia do Dr. George Palade.]

O conteúdo de gangliosídios do cérebro de um lactente com doença de Tay-Sachs está acentuadamente elevado. *A concentração de gangliosídio G_{M2} é muitas vezes mais elevada do que o normal, visto que o resíduo de* N-*acetilgalactosamina terminal é removido muito lentamente ou não é removido*. A enzima ausente ou deficiente é uma β-N-*acetil-hexosaminidase* específica.



A doença de Tay-Sachs pode ser diagnosticada durante o desenvolvimento fetal. Obtém-se uma amostra de líquido amniótico por amniocentese, e efetua-se um teste para a atividade de β-*N*-acetil-hexosaminidase.

A ácido fosfatídico fosfatase é uma enzima reguladora essencial no metabolismo dos lipídios

Embora os detalhes da regulação da síntese de lipídios ainda não estejam totalmente elucidados, as evidências disponíveis sugerem que a *ácido fosfatídico fosfatase* (PAP, do inglês *phosphatidic acid phosphatase*) atue em associação com a diacilglicerol quinase, desempenhando um papel essencial na regulação da síntese de lipídios. A PAP, também denominada lipina 1 nos mamíferos, controla a extensão da síntese de triacilgliceróis em comparação com os fosfolipídios e também regula o tipo de fosfolipídio sintetizado (Figura 26.7). Por exemplo, quando a atividade da PAP se encontra elevada, o fosfatidato é desfosforilado, e ocorre produção de diacilglicerol, que pode reagir com os alcoóis ativados apropriados, produzindo fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina ou fosfatidilcolina. O diacilglicerol também pode ser convertido em triacilgliceróis, e as evidências sugerem que a formação de triacilgliceróis pode atuar como tampão para os ácidos graxos, o que ajuda a regular os níveis de diacilglicerol e esfingolipídios, que desempenham funções de sinalização.

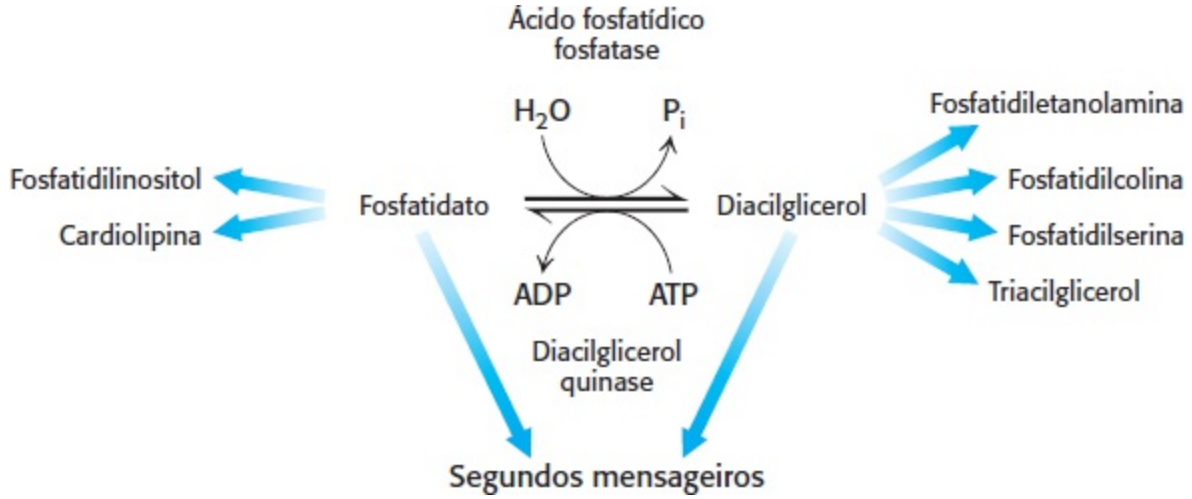


Figura 26.7 Regulação da síntese de lipídios. A ácido fosfatídico fosfatase é a enzima reguladora-chave na síntese de lipídios. Quando ativa, a PAP gera diacilglicerol, que pode reagir com alcoóis ativados, formando fosfolipídios, ou com acil-CoA de ácidos graxos para formar triacilgliceróis. Quando a PAP é inativa, o fosfatidato é convertido em CMPDAG para a síntese de diferentes fosfolipídios. A PAP também controla a quantidade de DAG e de fosfatidato, os quais funcionam como segundos mensageiros.

Quando a atividade da PAP está mais baixa, o fosfatidato é usado como precursor para diferentes fosfolipídios, como o fosfatidilinositol e a cardiolipina. Além disso, o próprio fosfatidato é uma molécula de sinalização. O fosfatidato regula o crescimento do retículo endoplasmático e das membranas nucleares e atua como cofator, estimulando a expressão de genes na síntese de fosfolipídios.

Quais são as moléculas de sinalização que regulam a atividade da PAP? O CDP-diacilglicerol, o fosfatidilinositol e a cardiolipina potencializam a atividade da PAP, enquanto a esfingosina e a di-hidroesfingosina a inibem.

Estudos realizados em camundongos mostram claramente a importância da PAP na regulação da síntese de ácidos graxos. A perda da função de PAP impede o desenvolvimento normal do tecido adiposo, resultando em lipodistrofia (grave perda da gordura corporal) e resistência à insulina. A atividade excessiva da PAP resulta em obesidade. A compreensão da regulação da síntese dos fosfolipídios constitui uma área interessante de pesquisa que futuramente deverá ser ativa.

26.2 O colesterol é sintetizado a partir da acetil-coenzima A em três estágios

Nesta seção, nos concentraremos na síntese do *colesterol*, um lipídio fundamental. Esse esteroide modula a fluidez das membranas celulares animais (Seção 12.5) e constitui o precursor de hormônios esteroides, como a progesterona, a testosterona, o estradiol e o cortisol. *Todos os 27 átomos de carbono do colesterol derivam da acetil-CoA, em um processo de síntese de três estágios* (Figura 26.8).

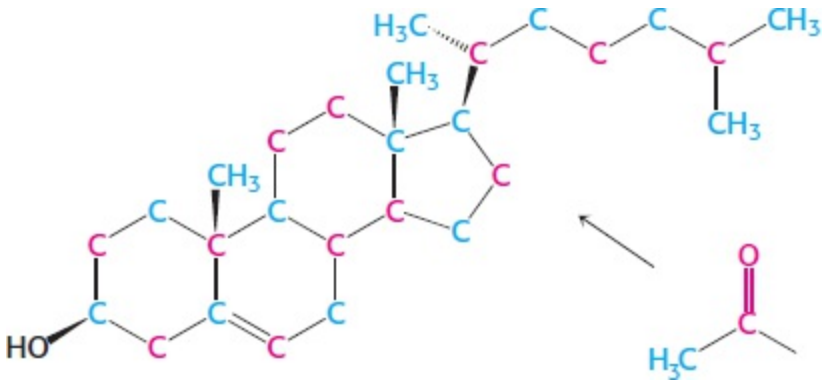


Figura 26.8 Marcação do colesterol. Experimentos de marcação com isótopos revelam a fonte dos átomos de carbono do colesterol sintetizado a partir do acetato marcado no grupo metila (azul) ou no átomo de carboxilato (vermelho).

1. O estágio 1 consiste na síntese de isopentenil pirofosfato, uma unidade de isopreno ativada, que constitui o bloco de construção básico do colesterol.

2. O estágio 2 consiste na condensação de seis moléculas de isopentenil pirofosfato para formar o esqualeno.

3. No estágio 3, o esqualeno é ciclizado, e o produto tetracíclico é então convertido em colesterol.

O primeiro estágio ocorre no citoplasma, enquanto os outros dois estágios são observados no retículo endoplasmático.

A síntese de mevalonato, que é ativado como isopentenil pirofosfato, inicia a síntese de colesterol

O primeiro estágio na síntese do colesterol consiste na formação de isopentenil pirofosfato a partir da acetil-CoA. Esse conjunto de reações começa com a formação de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG CoA) a partir de acetil-CoA e acetoacetil-CoA. Esse intermediário é reduzido a *mevalonato* para a síntese de colesterol (Figura 26.9). É importante lembrar que, de modo alternativo, pode haver produção de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA nas mitocôndrias, que é processada para a formação de corpos cetônicos, os quais são então secretados para fornecer uma fonte de energia para outros tecidos, notavelmente o cérebro em condições de inanição (Seção 22.3).

Colesterol

"O colesterol é a pequena molécula mais condecorada da biologia. Treze Prêmios Nobel foram conferidos a cientistas que dedicaram a maior parte de suas carreiras ao colesterol. Desde que foi isolado de cálculos biliares, em 1784, o colesterol tem exercido uma fascinação quase hipnótica sobre cientistas das mais diversas áreas da ciência e da medicina... O colesterol é uma molécula com face de Janus. A mesma propriedade que o torna útil nas membranas celulares, isto é, a sua absoluta insolubilidade em água, também o torna letal."

– Michael Brown e Joseph Goldstein, por ocasião da entrega de um Prêmio Nobel pela elucidação do controle dos níveis sanguíneos de colesterol. Nobel Lectures (1985) © The Nobel Foundation, 1985

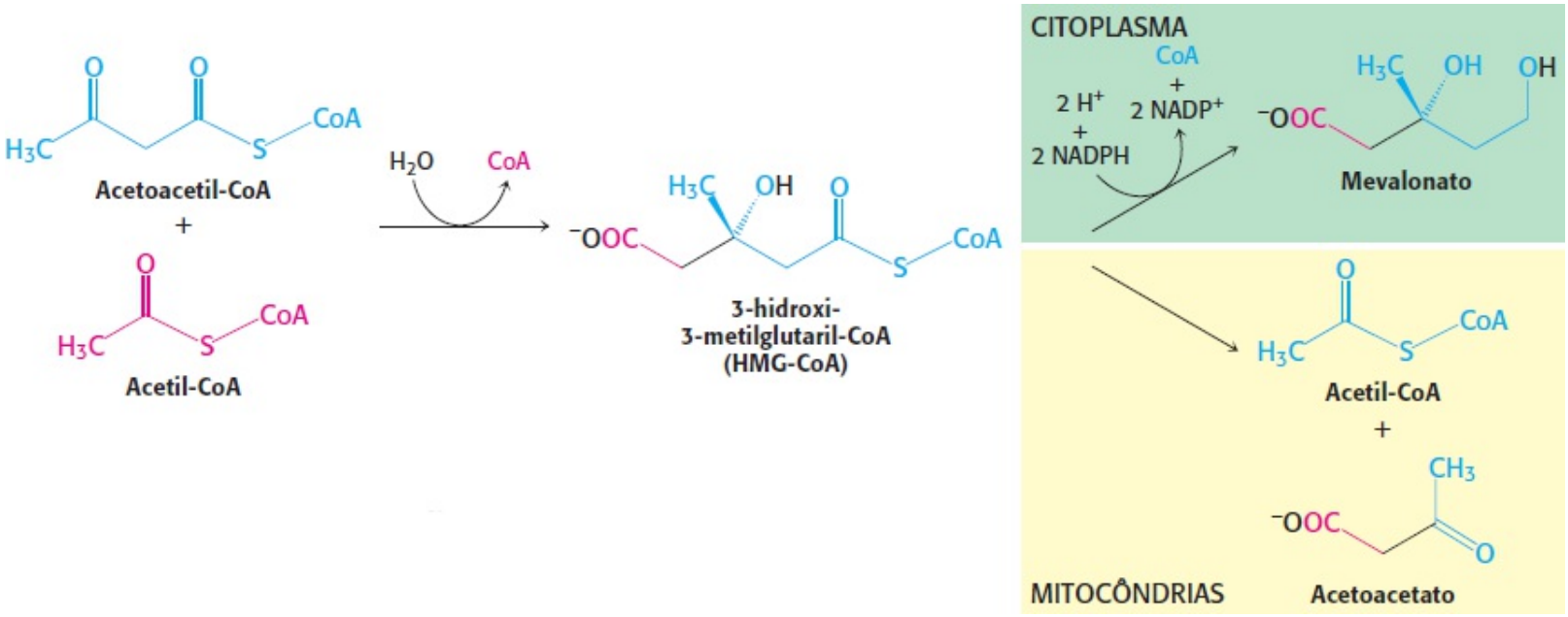
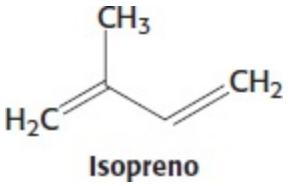


Figura 26.9 Destinos da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. No citoplasma, a HMG-CoA é convertida em mevalonato. Nas mitocôndrias, é convertida em acetil-CoA e acetoacetato.

A síntese de mevalonato constitui a etapa comprometida na formação de colesterol. A enzima que catalisa essa etapa irreversível, a *3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase* (HMG-CoA redutase), representa um importante local de controle na biossíntese do colesterol, conforme discutido adiante.

3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA + 2 NADPH + 2 H^+ →

mevalonato + 2 $NADP^+$ + CoA



A HMG-CoA redutase é uma proteína de membrana integral encontrada no retículo endoplasmático.

O mevalonato é convertido em *3-isopentenil pirofosfato*, em três reações consecutivas que exigem a presença de ATP (Figura 26.10). Na última etapa, a liberação de CO_2 produz isopentenil pirofosfato, uma unidade de isopreno ativada, que constitui um bloco de construção básico para muitas biomoléculas importantes em todos os reinos da vida.

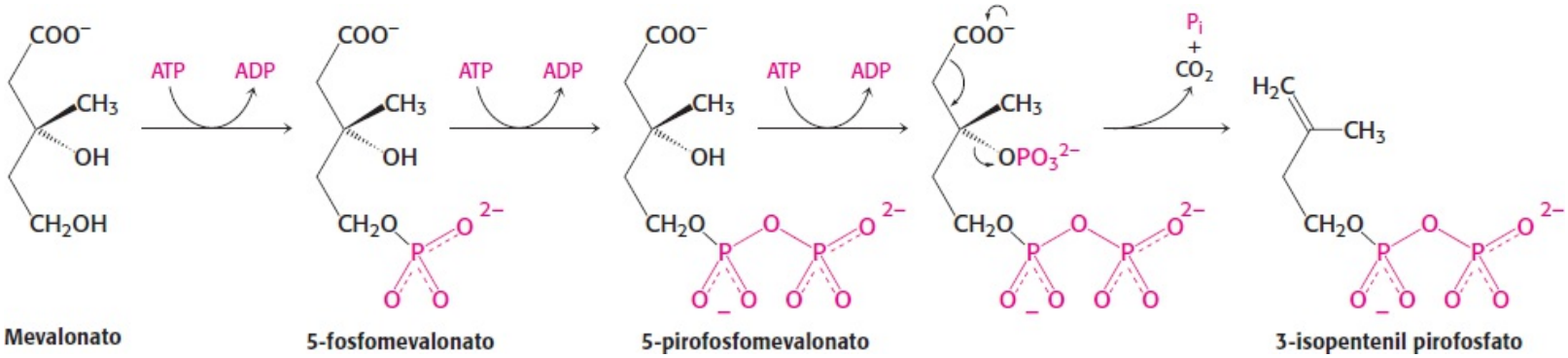


Figura 26.10 Síntese de isopentenil pirofosfato. Esse intermediário ativado é formado a partir do mevalonato em três etapas, exigindo a presença de ATP, seguidas de descarboxilação.

O esqualeno (C_{30}) é sintetizado a partir de seis moléculas de isopentenil pirofosfato (C_5)

O esqualeno é sintetizado a partir do isopentenil pirofosfato pela sequência de reações

$$C_5 \rightarrow C_{10} \rightarrow C_{15} \rightarrow C_{30}$$

Esse estágio na síntese do colesterol começa com a isomerização do *isopentenil pirofosfato* em *dimetilalil pirofosfato*.

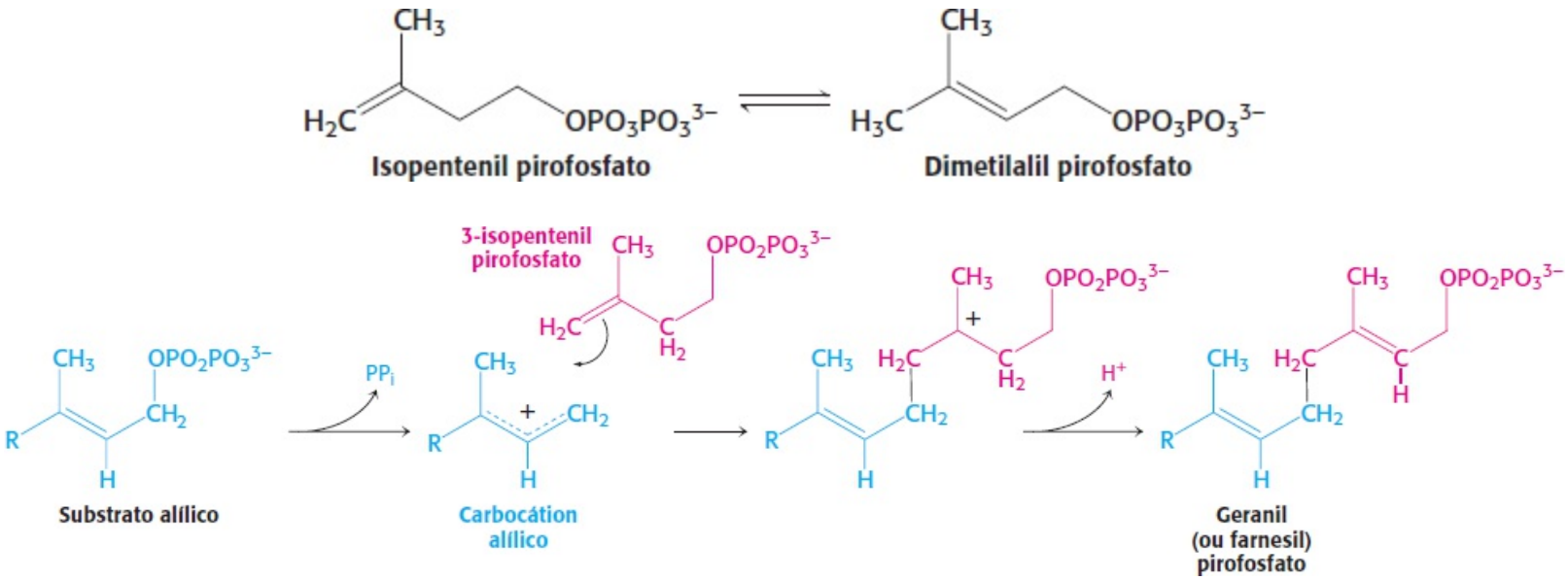


Figura 26.11 Mecanismo de condensação na síntese do colesterol. Mecanismo de união do dimetilalil pirofosfato e do isopentenil pirofosfato para a formação do geranil pirofosfato. O mesmo mecanismo é utilizado para acrescentar outro isopentil pirofosfato, formando farnesil pirofosfato.

Essas duas unidades isoméricas C_5 (uma de cada tipo) se condensam para formar um composto C_{10}: o isopentenil pirofosfato ataca um carbocátion alílico formado a partir do dimetilalil pirofosfato, produzindo *geranil pirofosfato* (Figura 26.11). O mesmo tipo de reação ocorre novamente: o geranil pirofosfato é convertido em um íon carbônio alílico, que é atacado pelo isopentenil pirofosfato. O composto C_{15} resultante é denominado *farnesil pirofosfato*. A mesma enzima, a *geranil transferase*, catalisa cada uma dessas condensações.

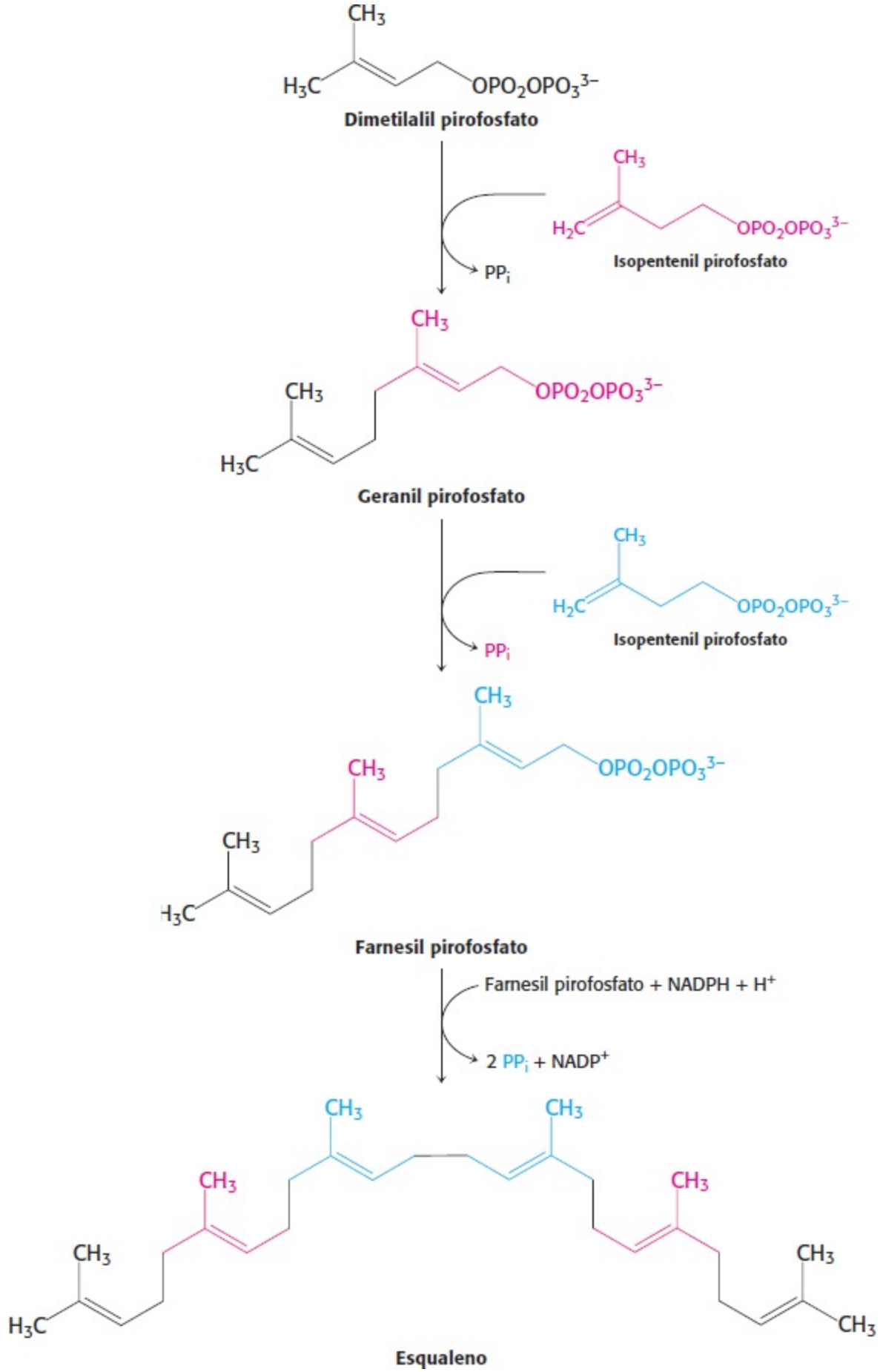


Figura 26.12 Síntese do esqualeno. Uma molécula de dimetilalil pirofosfato e duas moléculas de isopentenil pirofosfato se condensam para formar farnesil pirofosfato. O acoplamento das caudas das duas moléculas de farnesil pirofosfato produz o esqualeno.

A última etapa na síntese do *esqualeno* é uma condensação redutora entre as cabeças de duas

moléculas de farnesil pirofosfato, em uma reação catalisada pela enzima do retículo endoplasmático, a *esqualeno sintase*.

2 farnesil pirofosfato (C_{15}) + NADPH →

Esqualeno (C_{30}) + 2 PP_i + $NADP^+$ + H^+

As reações que levam das unidades de C_5 até o esqualeno, um isoprenoide C_{30}, estão resumidas na Figura 26.12.

O esqualeno cicliza para formar colesterol

O estágio final na biossíntese de colesterol começa com a ciclização do esqualeno (Figura 26.13). O esqualeno é inicialmente ativado pela sua conversão em epóxido de esqualeno (2,3-óxido-esqualeno), em uma reação que utiliza O_2 e NADPH. Em seguida, o epóxido de esqualeno é ciclizado a *lanosterol* pela *óxido-esqualeno ciclase*. Essa notável transformação ocorre de modo coordenado. A enzima mantém o epóxido de esqualeno em uma conformação apropriada e inicia a reação pela protonação do oxigênio do epóxido. O carbocátion formado sofre rearranjo espontâneo, produzindo lanosterol. O lanosterol é convertido em colesterol em um processo de múltiplas etapas, com remoção de três grupos metila, redução de uma dupla-ligação pelo NADPH e migração da outra dupla-ligação (Figura 26.14).

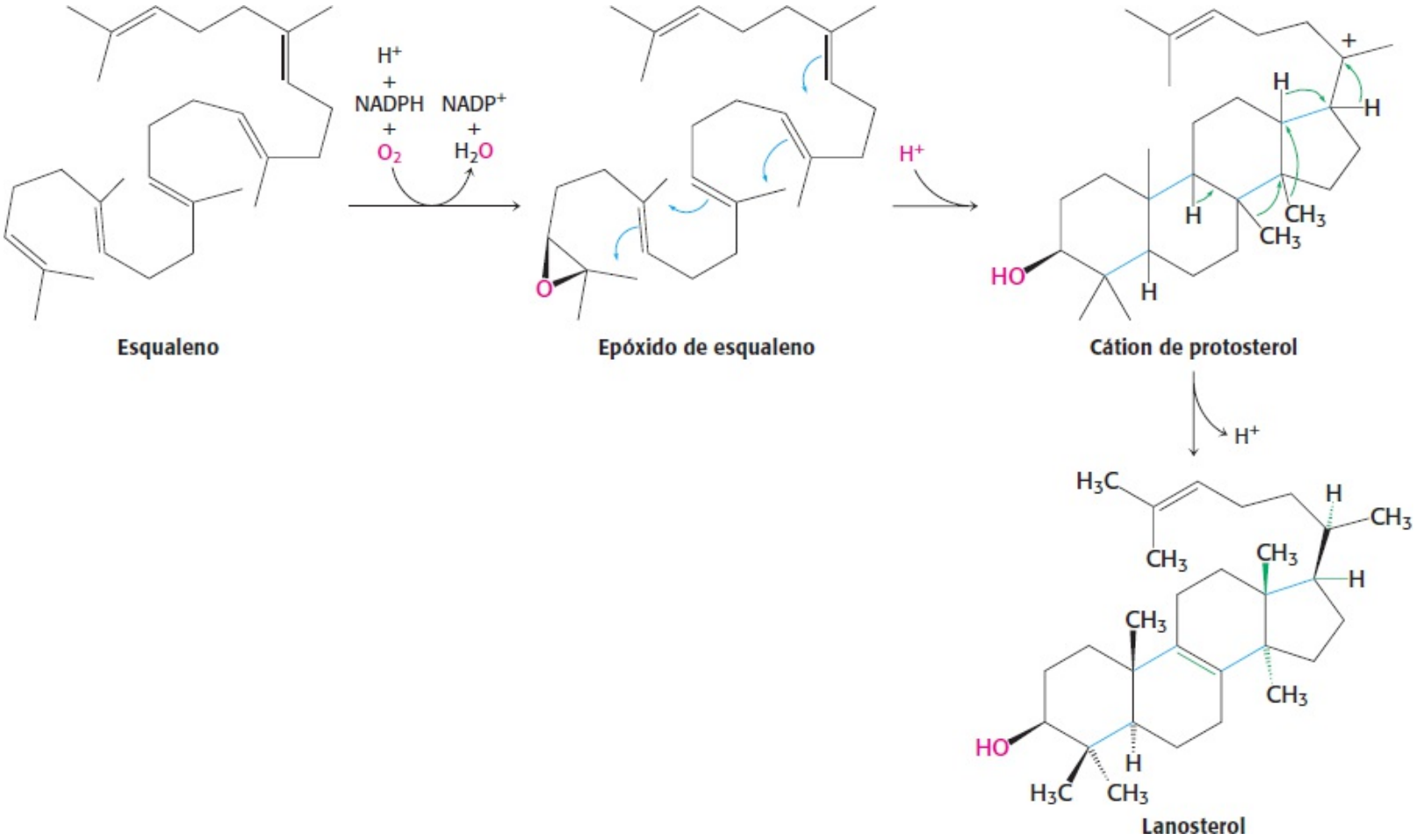


Figura 26.13 Ciclização do esqualeno. A formação do núcleo esteroide a partir do esqualeno começa com a formação do epóxido de esqualeno. Esse intermediário é protonado para formar um carbocátion, que cicliza para formar uma estrutura tetracíclica, que sofre rearranjo para formar lanosterol.

26.3 A regulação complexa da biossíntese de colesterol ocorre em vários níveis

O colesterol pode ser obtido da alimentação, ou pode ser sintetizado *de novo*. A biossíntese de colesterol constitui uma das vias metabólicas conhecidas mais altamente reguladas. A velocidade de biossíntese pode variar várias centenas de vezes, dependendo da quantidade de colesterol consumida na alimentação. Um adulto cuja dieta seja pobre em colesterol tipicamente sintetiza cerca de 800 mg de colesterol por dia. O fígado constitui o principal local de síntese de colesterol nos mamíferos, apesar de o intestino também formar quantidades significativas. A velocidade de síntese de colesterol por esses órgãos responde altamente ao nível celular de colesterol. *Essa regulação por retroalimentação é mediada principalmente por mudanças na quantidade e atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase*. Conforme descrito anteriormente (p. 773), essa enzima catalisa a formação de mevalonato, a etapa comprometida na biossíntese de colesterol. A HMG-CoA redutase é controlada de múltiplas maneiras:

1. A velocidade de *síntese do mRNA da redutase* é controlada pela *proteína de ligação do elemento regulador de esterol* (SREBP, *do inglês sterol regulatory element binding protein*). Esse fator de transcrição liga-se a uma sequência curta de DNA, denominada *elemento regulador de esterol* (SRE, *do inglês sterol regulatory element*) no lado 5′ do gene da redutase. O fator de transcrição liga-se ao SRE quando os níveis de colesterol estão baixos e intensifica a transcrição. Em seu estado inativo, a SREBP está localizada na membrana do retículo endoplasmático, onde está associada à proteína ativadora de clivagem de SREBP (SCAP), uma proteína de membrana integral. A SCAP é o sensor de colesterol. Quando os níveis de colesterol declinam, a SCAP escolta a SREBP em pequenas vesículas da membrana até o complexo de Golgi, onde é liberada da membrana por duas clivagens proteolíticas específicas (Figura 26.15). A primeira clivagem libera um fragmento de SREBP da SCAP, enquanto a segunda clivagem libera o domínio regulador da membrana. A proteína liberada migra para o núcleo e liga-se ao SRE do gene da HMG-CoA redutase, bem como a vários outros genes na via de biossíntese do colesterol, intensificando a transcrição. Quando ocorre elevação dos níveis de colesterol, a liberação proteolítica da SREBP é bloqueada, e a SREBP no núcleo é rapidamente degradada. Esses dois eventos interrompem a transcrição de genes das vias de biossíntese do colesterol.

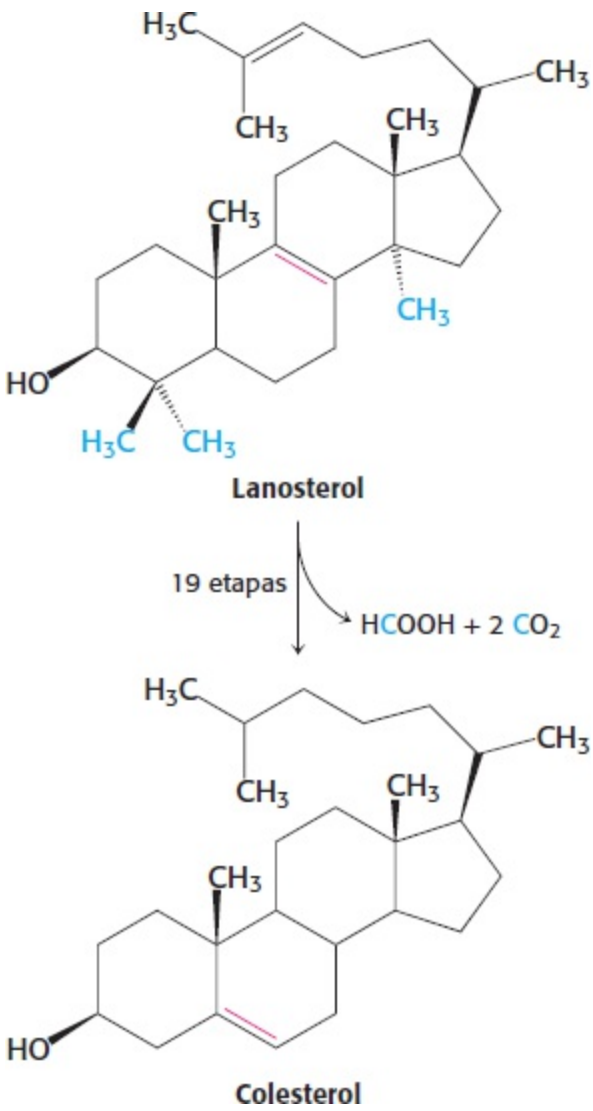


Figura 26.14 Formação do colesterol. O lanosterol é convertido em colesterol em um processo complexo.

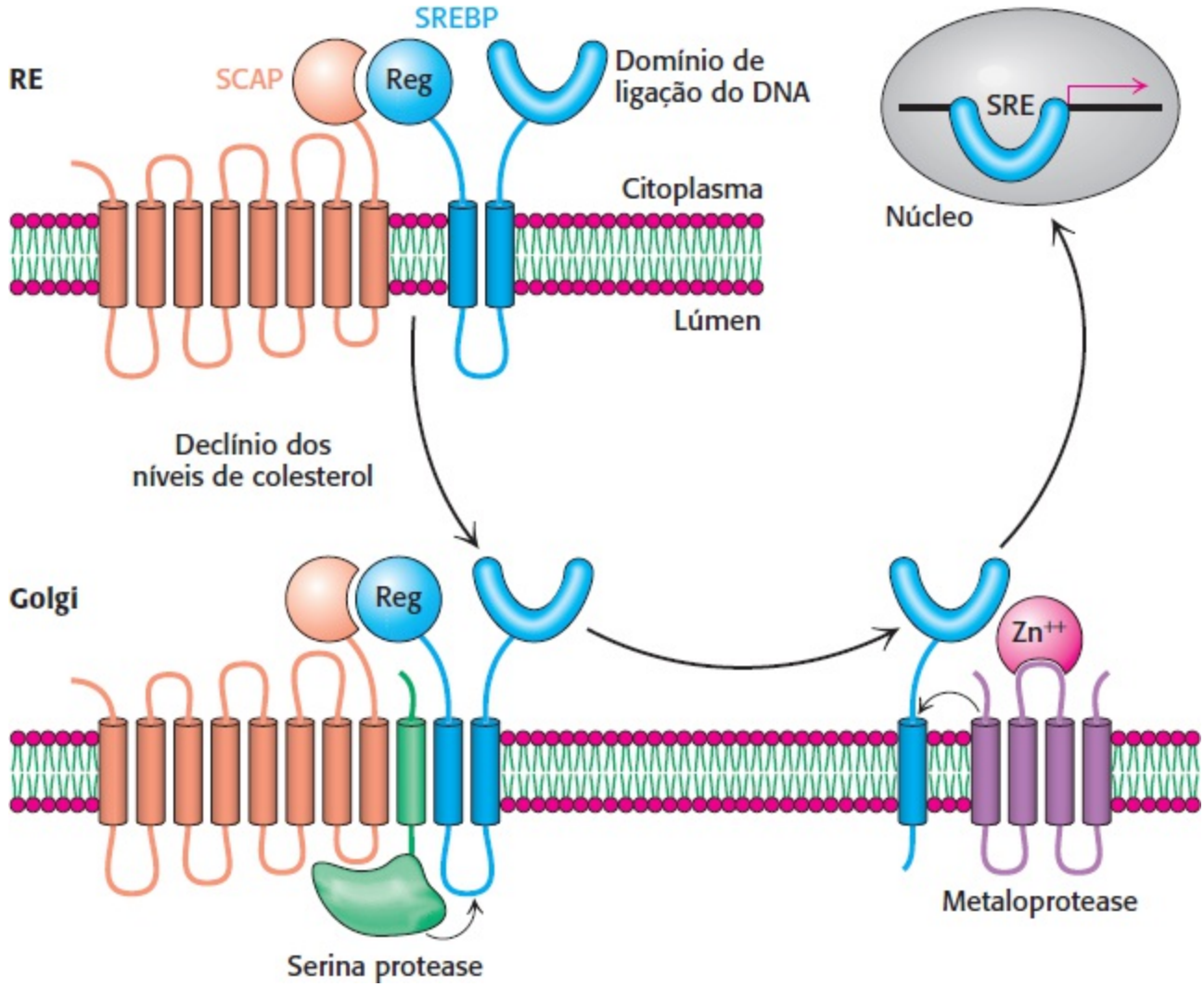


Figura 26.15 Via da SREBP. A SREBP localiza-se no retículo endoplasmático, onde se liga à SCAP pelo seu domínio regulador (Reg). Quando os níveis de colesterol declinam, a SCAP e a SREBP deslocam-se para o complexo de Golgi, onde a SREBP sofre clivagens proteolíticas sucessivas por uma serina protease e por uma metaloprotease. O domínio de ligação do DNA liberado migra até o núcleo para alterar a expressão gênica. [De ilustração fornecida pelos Dr. Michael Brown e Dr. Joseph Goldstein.]

Qual o mecanismo molecular que retém a SCAP-SREBP no RE quando o colesterol está presente, porém possibilita o movimento até o complexo de Golgi quando a concentração de colesterol está baixa? Quando o nível de colesterol está baixo, a SCAP liga-se a proteínas vesiculares que facilitam o transporte da SCAP-SREBP até o aparelho de Golgi, conforme já descrito. Na presença de colesterol, a SCAP liga-se ao colesterol, o que produz mudança estrutural da SCAP, possibilitando a sua ligação a outra proteína do retículo endoplasmático, denominada Insig (Figura 26.16). A Insig constitui a âncora que conserva a SCAP e, portanto, a SREBP no retículo endoplasmático na presença de colesterol. As interações entre a SCAP e a Insig também podem ser forjadas quando a Insig se liga ao 25-hidroxicolesterol, um metabólito do colesterol. Por conseguinte, duas interações esteroide-proteína distintas servem para impedir o movimento inapropriado da SCAP-SREBP até o complexo de Golgi.

2. A taxa de *tradução do mRNA da redutase* é inibida por metabólitos não esteróis derivados do mevalonato.

3. A *degradação da redutase* é estritamente controlada. A enzima é bipartida: o seu domínio citoplasmático é responsável pela catálise, enquanto o *seu domínio de membrana identifica sinais*

que levam à sua degradação. O domínio de membrana pode sofrer mudanças estruturais em *resposta a concentrações crescentes de esteróis, como o lanosterol e o 25-hidroxicolesterol*. Nessas condições, a redutase parece ligar-se a um subgrupo de Insig que está associado às enzimas de ubiquitinação (Figura 26.17). A redutase é poliubiquitinada e subsequentemente extraída da membrana em um processo que exige a presença de gerenilgeraniol. A redutase extraída é então degradada pelo proteassomo. A regulação combinada nos níveis de transcrição, tradução e degradação pode alterar a quantidade da enzima na célula em mais de 200 vezes.

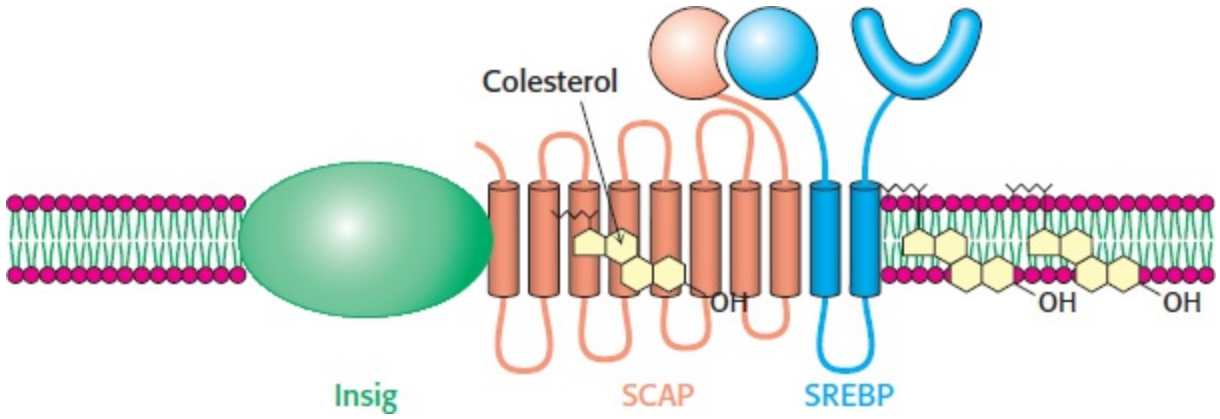


Figura 26.16 A Insig regula o movimento de SCAP-SREBP. Na presença de colesterol, a Insig interage com a SCAP-SREBP e impede a ativação da SREBP. A ligação do colesterol à SCAP ou a ligação do 25-hidroxicolesterol à Insig facilitam a interação da Insig e da SCAP, conservando a SCAP-SREBP no retículo endoplasmático. Na ausência de colesterol ou seus derivados, a SCAP interage com proteínas de transporte e guia a SREBP até o aparelho de Golgi para a sua ativação. [De M. S. Brown and J. L. Goldstein. Cholesterol feedback: From Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J. Lipid Res*. 50:S15-S27, 2009.]

4. *A fosforilação diminui a atividade da redutase*. Essa enzima, à semelhança da acetil-CoA carboxilase (que catalisa a etapa comprometida na síntese de ácidos graxos, Seção 22.5), é desativada por uma proteína quinase ativada por AMP. Por conseguinte, a síntese de colesterol cessa quando o nível de ATP se encontra baixo.

Como veremos adiante, todos os quatro mecanismos reguladores são modulados por receptores que identificam a presença de colesterol no sangue.

As lipoproteínas transportam colesterol e triacilgliceróis por todo o organismo

O colesterol e os triacilgliceróis são transportados nos líquidos orgânicos na forma de *partículas de lipoproteínas*. Esse transporte é importante por várias razões. Em primeiro lugar, as partículas de lipoproteínas constituem o meio pelo qual os triacilgliceróis, provenientes do intestino ou do fígado, são transportados até os tecidos para uso como fonte de energia ou para armazenamento. Em segundo lugar, os ácidos graxos dos triacilgliceróis que compõem as partículas de lipoproteínas são incorporados em fosfolipídios para a síntese de membrana. De modo semelhante, o colesterol é um componente vital das membranas e um precursor das poderosas moléculas de sinalização, os hormônios esteroides. Por fim, as células não são capazes de degradar o núcleo esteroide. Em consequência, o colesterol precisa ser usado bioquimicamente ou excretado pelo fígado. O excesso de colesterol desempenha um papel no desenvolvimento da aterosclerose. As partículas de lipoproteínas atuam na homeostasia do colesterol, transportando a molécula dos locais de síntese para os locais de utilização e, por fim, para o fígado para a sua excreção.

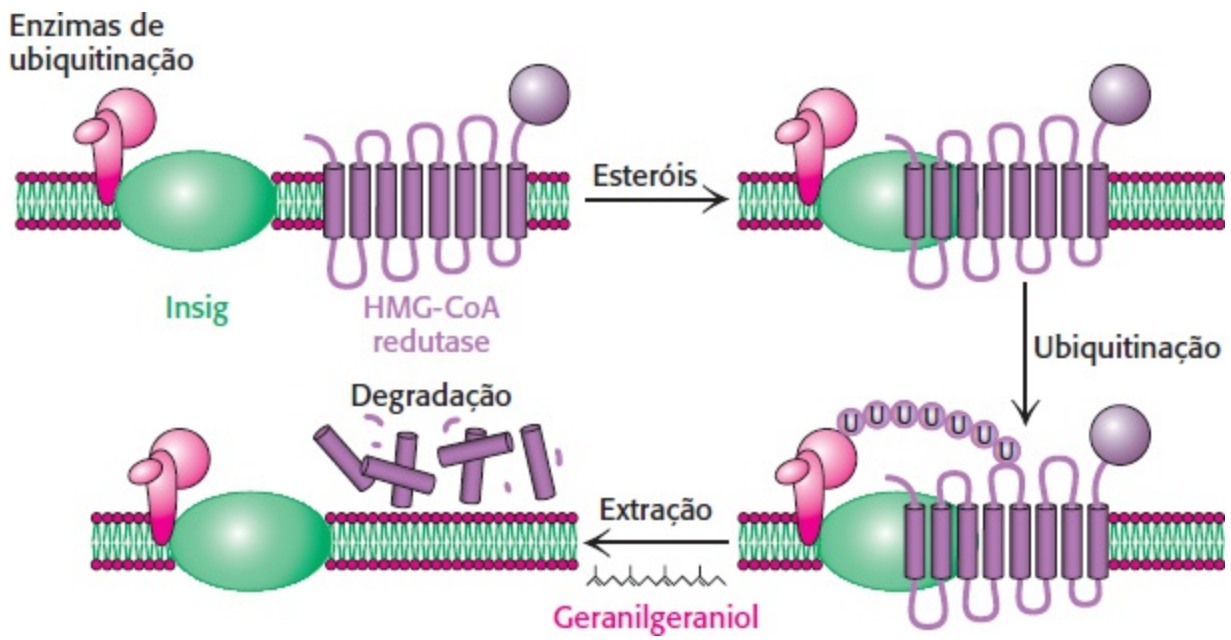


Figura 26.17 A Insig facilita a degradação da HMG-CoA redutase. Na presença de esteróis, uma subclasse de Insig associada a enzimas de ubiquitinação liga-se à HMG-CoA redutase. Essa interação resulta em ubiquitinação da enzima. Essa modificação e a presença de geranilgeraniol levam à extração da enzima da membrana e sua degradação pelo proteassomo. [De R. A. DeBose-Boyd. Feedback regulation of cholesterol synthesis: Sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res*. 18:609-621, 2008.]

Cada partícula de lipoproteína consiste em um cerne de lipídios hidrofóbicos, circundados por uma camada de lipídios mais polares e proteínas. Os componentes proteicos desses agregados macromoleculares, denominados apoproteínas, desempenham duas funções: *solubilizam os lipídios hidrofóbicos e contêm sinais de endereçamento celular*. As apolipoproteínas são sintetizadas e secretadas pelo fígado e pelo intestino. As partículas de lipoproteínas são classificadas de acordo com a sua densidade crescente (Tabela 26.1): *quilomícrons, remanescentes de quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa* (VLDL, *do inglês very low density lipoproteins*), *lipoproteínas de densidade intermediária* (IDL, *do inglês intermediate-density lipoproteins*), *lipoproteínas de baixa densidade* (LDL, *do inglês low-density lipoproteins*) e *lipoproteínas de alta densidade* (HDL, *do inglês high density lipoporoteins*). Essas classes são divididas em numerosos subtipos. Além disso, as partículas de lipoproteínas podem trocar de classe à medida que liberam a sua carga ou a captam, mudando, assim, a sua densidade.

Os triacilgliceróis, o colesterol e outros lipídios obtidos da alimentação são transportados para fora do intestino, na forma de grandes *quilomícrons* (Seção 22.1). Essas partículas apresentam uma densidade muito baixa, visto que os triacilgliceróis constituem cerca de 90% de seu conteúdo. A apolipoproteína B-48 (apo B-48), uma proteína grande (240 kDa), forma um revestimento esférico anfipático em torno do glóbulo de gordura; a face externa dessa camada é hidrofílica. Os triacilgliceróis nos quilimícrons são liberados por hidrólise pelas *lipoproteínas lipases*. Essas enzimas estão localizadas no revestimento dos vasos sanguíneos nos músculos e em outros tecidos que utilizam ácidos graxos como fonte de energia ou na síntese de lipídios. Em seguida, o fígado capta os resíduos ricos em colesterol, conhecidos como *remanescentes de quilomícrons*.

As partículas de lipoproteínas também são de suma importância no transporte de lipídios do fígado, que constitui um importante local de síntese de triacilgliceróis e colesterol, para outros tecidos no corpo (Figura 26.18). Os triacilgliceróis e o colesterol que excedem as próprias necessidades do fígado são exportados para o sangue, sob a forma de lipoproteínas de densidade

muito baixa. Essas partículas são estabilizadas por duas apolipoproteínas – a apo B-100 e a apo E (34 kDa). A apo B-100, uma das maiores proteínas conhecidas (513 kDa), é uma versão mais longa da apo B-48. Ambas as proteínas apo B são codificadas pelo mesmo gene e produzidas a partir da mesma transcrição inicial de RNA. No intestino, a edição do RNA (Seção 29.3) modifica o transcrito, gerando o mRNA para a apo B-48, a forma truncada. Os triacilgliceróis presentes nas lipoproteínas de densidade muito baixa, assim como nos quilomícrons, são hidrolisados por lipases na superfície dos capilares, e os ácidos graxos liberados são captados pelo músculo e por outros tecidos. Os remanescentes assim produzidos, que são ricos em ésteres de colesteril, são denominados *lipoproteínas de densidade intermediária*. Essas partículas têm dois destinos. Metade delas é captada pelo fígado para ser processada, e metade é convertida em lipoproteínas de baixa densidade pela remoção de mais triacilglicerol por lipases teciduais que absorvem os ácidos graxos liberados.

Tabela 26.1 Propriedades das lipoproteínas plasmáticas.

					Composição (%)				
Lipoproteínas plasmáticas	Densidade (g m/−1)	Diâmetro (nm)	Apolipoproteína	Papel fisiológico	TAG	CE	C	PL	P
Quilomícrons	<0,95	75 a 1.200	B-48, C, E	Transporte de lipídios da alimentação	86	3	1	8	2
Lipoproteína de densidade muito baixa	0,95 a 1,006	30 a 80	B-100, C, E	Transporte de lipídios endógenos	52	14	7	18	8
Lipoproteína de densidade intermediária	1,006 a 1,019	15 a 35	B-100, E	Precursor de LDL	38	30	8	23	11
Lipoproteína de baixa densidade	1,019 a 1,063	18 a 25	B-100	Transporte de colesterol	10	38	8	22	21
Lipoproteína de alta densidade	1,063 a 1,21	7,5 a 20	A	Transporte reverso de colesterol	5 a 10	14 a 21	3 a 7	19 a 29	33 a 57

TAG, triacilglicerol; CE, éster de colesteril; C, colesterol livre; PL, fosfolipídio; P, proteína.

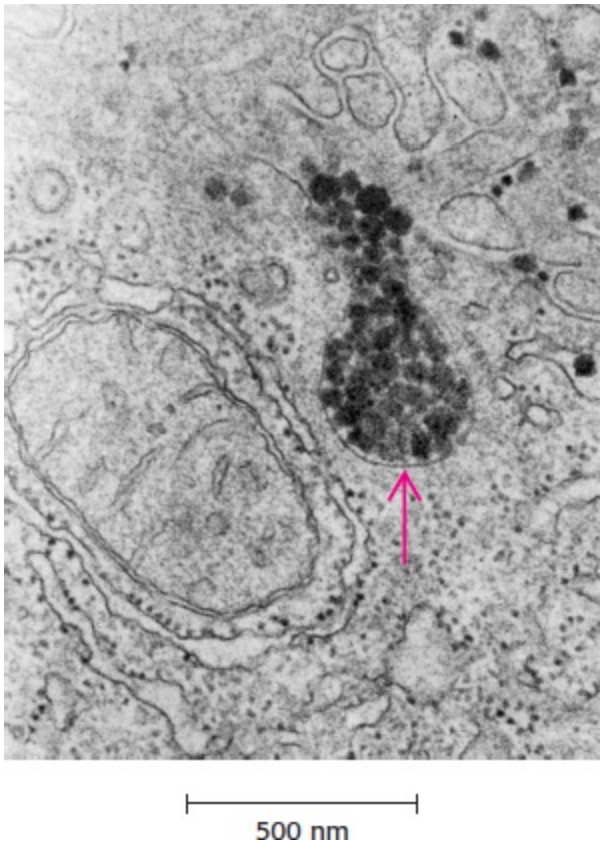


Figura 26.18 Local de síntese do colesterol. Micrografia eletrônica de parte de uma célula hepática ativamente empenhada na síntese e na secreção de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). A seta aponta para uma vesícula que está liberando o seu conteúdo de partículas de VLDL. [Cortesia do Dr. George Palade.]

A lipoproteína de baixa densidade constitui o principal carreador de colesterol no sangue (Figura 26.19). Essa lipoproteína contém um cerne de cerca de 1.500 moléculas de colesterol esterificadas a ácidos graxos. A cadeia de ácidos graxos mais comum nesses ésteres é o linoleato, um ácido graxo poli-insaturado. Esse cerne altamente hidrofóbico é circundado por uma camada de fosfolipídios e moléculas de colesterol não esterificadas. A camada também contém uma única cópia de apo B-100, que é reconhecida pelas célulasalvo. *A função da LDL consiste em transportar o colesterol até os tecidos periféricos e em regular a síntese* de novo *de colesterol nesses locais*, conforme descrito na p. 781. Um propósito diferente é atendido pela *lipoproteína de alta densidade*, que capta o colesterol liberado no plasma por células mortas e por membranas em processo de renovação e o libera para o fígado para a sua excreção. Uma aciltransferase na HDL esterifica essas moléculas de colesterol, que, em seguida, retornam ao fígado pela HDL (Figura 26.20).

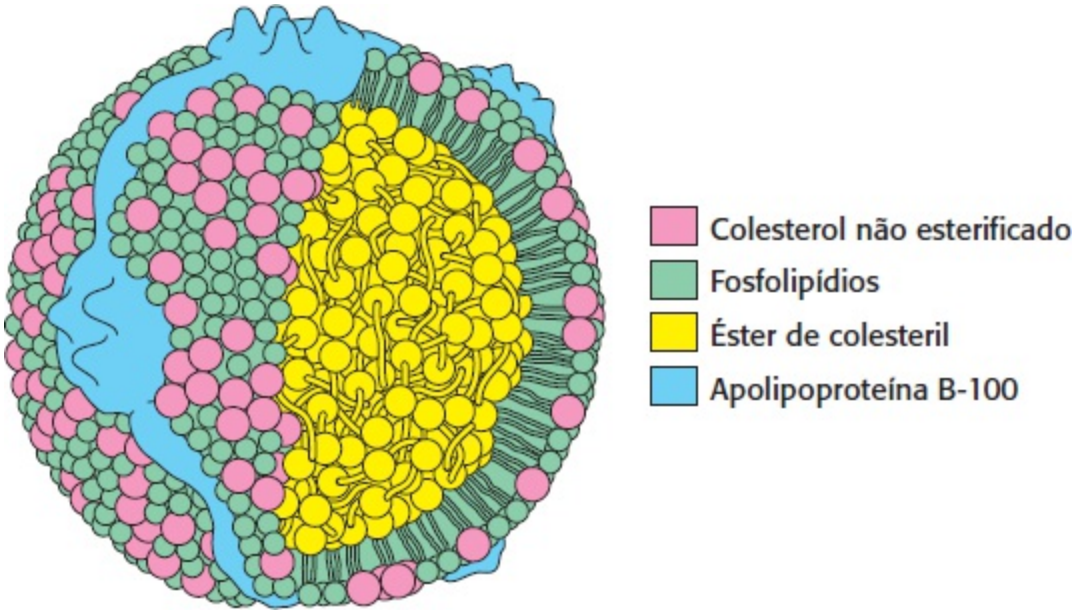


Figura 26.19 Modelo esquemático da lipoproteína de baixa densidade. A partícula de LDL tem um diâmetro de aproximadamente 22 nm (220 Å).

Os níveis sanguíneos de determinadas lipoproteínas podem servir para fins diagnósticos

O colesterol, quando presente em níveis séricos elevados, provoca doença e morte, uma vez que contribui para a formação de placas ateroscleróticas nas artérias de todo o corpo. Esse colesterol em excesso está presente na forma de partículas de lipoproteína de baixa densidade, constituindo o denominado "colesterol ruim".

A *lipoproteína de alta densidade* é algumas vezes designada como "colesterol bom". A HDL atua como transportador que faz o colesterol circular por todo o organismo. A HDL liga-se ao colesterol liberado dos macrófagos e dos tecidos periféricos e o esterifica; a seguir, transfere os ésteres de colesteril para os tecidos que utilizam o colesterol na síntese de hormônios esteroides, ou para o fígado, onde o colesterol é convertido em sais biliares ou excretado. Um receptor específico medeia a atracagem da HDL a esses tecidos. A natureza exata do efeito protetor dos níveis de HDL não é conhecida; todavia, os possíveis mecanismos são examinados na p. 782.

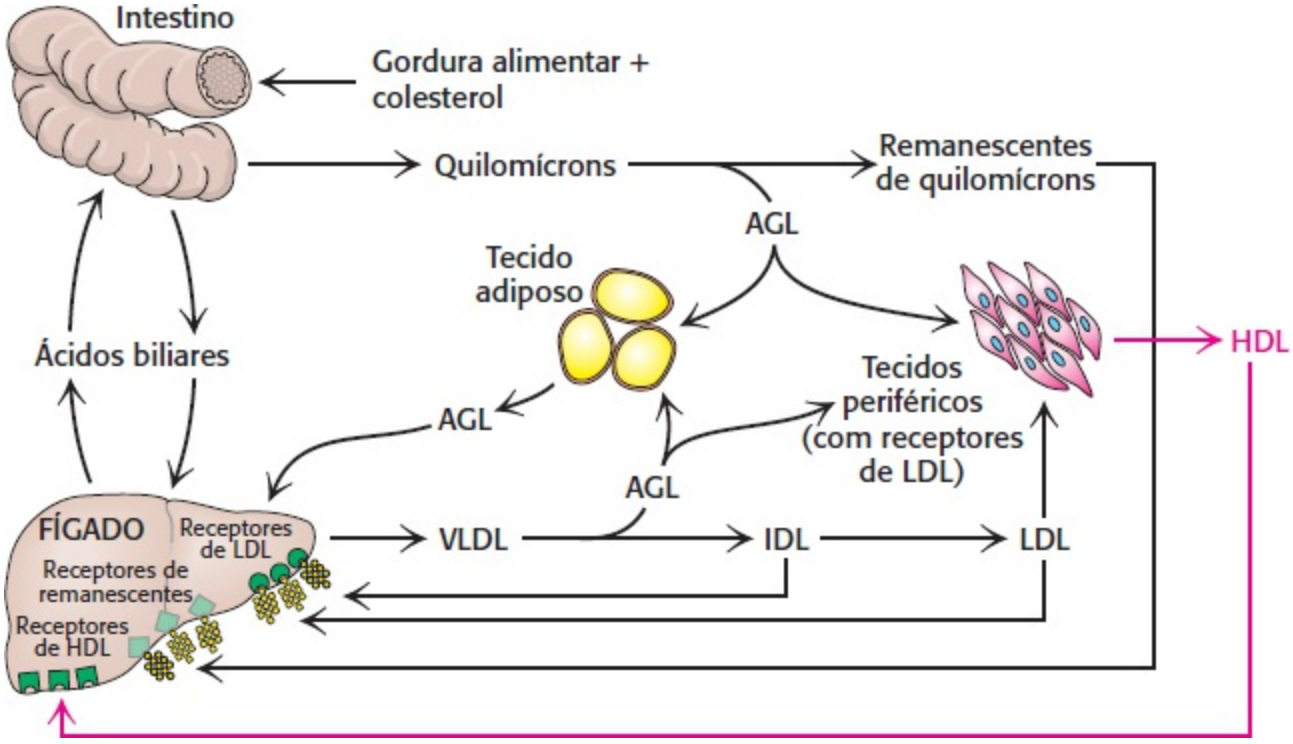


Figura 26.20 Visão geral do metabolismo das partículas de lipoproteínas. Os ácidos graxos estão abreviados como AGL. [De J.G. Hardman (Ed.), L. L. Limbird (Ed.), e A. G. Gilman (Consult. Ed.), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed. (McGraw-Hill, 2001), p. 975, Fig. 36.1.]

A razão entre colesterol na forma de LDL e colesterol na forma de HDL pode ser usada para avaliar a suscetibilidade ao desenvolvimento de doença cardíaca. Para uma pessoa saudável, a razão HDL/LDL é de 3,5.

As lipoproteínas de baixa densidade desempenham um papel central no metabolismo do colesterol

O metabolismo do colesterol deve ser regulado com precisão para evitar o desenvolvimento de aterosclerose. O modo desse controle no fígado, que é o principal local de síntese de colesterol, já foi discutido: o colesterol da alimentação reduz a atividade e a quantidade de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase, a enzima que catalisa a etapa comprometida. Os estudos realizados por Michael Brown e Joseph Goldstein representam fontes de esclarecimento para o controle do metabolismo do colesterol nas células não hepáticas. Em geral, as células fora do fígado e do intestino obtêm o colesterol do plasma, em lugar de sintetizá-lo *de novo*. Especificamente, *a sua principal fonte de colesterol é constituída pela lipoproteína de baixa densidade*. O processo de captação de LDL, denominado *endocitose mediada por receptor*, serve como paradigma para a captação de numerosas moléculas (Figura 26.21).

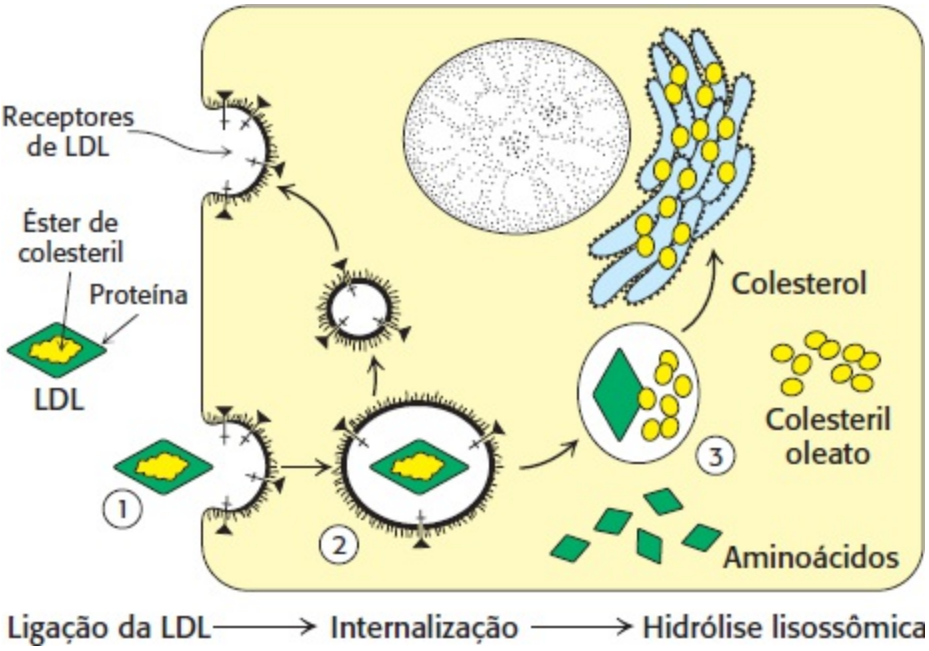
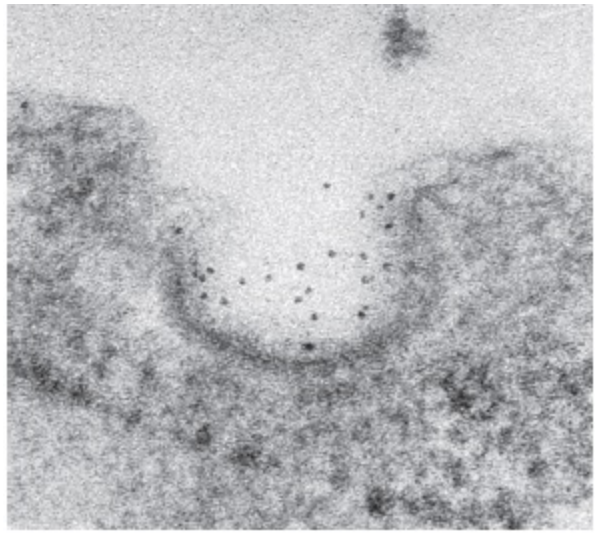
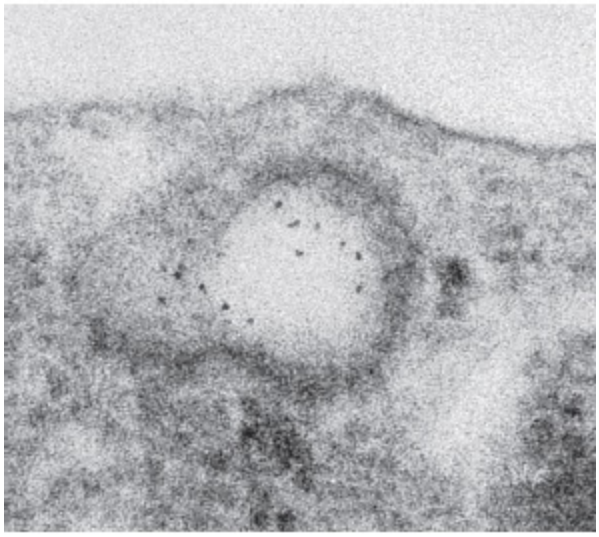


Figura 26.21 Endocitose mediada por receptor. O processo de endocitose mediada por receptor é ilustrado para o complexo transportador de colesterol, a lipoproteína de baixa densidade (LDL): (**1**) A LDL liga-se a um receptor específico, o receptor de LDL; (**2**) esse complexo sofre invaginação, formando uma vesícula interna; (**3**) após separação de seu receptor, a vesícula contendo LDL funde-se com um lisossomo, levando a degradação da LDL e liberação do colesterol.

A endocitose começa quando a apolipoproteína B-100 na superfície de uma partícula de LDL se liga a uma proteína receptora específica na membrana plasmática das células não hepáticas. Os receptores de LDL estão localizados em regiões especializadas, denominadas *depressões revestidas*, que contêm uma proteína especializada, denominada *clatrina*. O complexo receptor-LDL é então internalizado por *endocitose, isto é*, a membrana plasmática na vizinhança do complexo sofre invaginação e, em seguida, funde-se para formar uma vesícula endocítica, denominada *endossomo* (Figura 26.22). O endossomo é acidificado, fazendo com que o receptor libere a sua carga. O receptor retorna à membrana celular em uma vesícula de reciclagem. O tempo de ida e volta de um receptor é de cerca de 10 min; durante a sua vida de cerca de um dia, cada receptor pode internalizar centenas de partículas de LDL dentro da célula. As vesículas que contêm LDL então se fundem com *lisossomos*, que consistem em vesículas ácidas que contêm uma ampla gama de enzimas de degradação. O componente proteico das LDL é hidrolisado a aminoácidos livres. Os ésteres de colesteril nas LDL são hidrolisados por uma lipase ácida lisossômica. *Em seguida, o colesterol não esterificado liberado pode ser utilizado para a biossíntese de membranas*. Como alternativa, pode ser *reesterificado para o seu armazenamento dentro da célula*. De fato, o colesterol livre ativa a *acil-CoA:colesterol aciltransferase* (ACAT), a enzima que catalisa essa reação. O colesterol reesterificado contém principalmente oleato e palmitoleato, que são ácidos graxos monoinsaturados, ao contrário dos ésteres de colesteril nas LDL, que são ricos em linoleato, um ácido graxo poli-insaturado (ver Tabela 12.1). É imperativo que o colesterol seja reesterificado. A presença de altas concentrações de colesterol não esterificado compromete a integridade das membranas celulares.



A



B

Figura 26.22 Endocitose da LDL ligada a seu receptor. A. Micrografia eletrônica mostrando a LDL (conjugada com ferritina para a sua visualização na forma de pontos escuros) ligada a uma região de depressão revestida na superfície de um fibroblasto humano em cultura. **B**. Micrografia mostrando a invaginação dessa região e a sua fusão, formando uma vesícula endocítica. [De R. G. W. Anderson, M. S. Brown, and J. L. Goldstein. *Cell* 10:351-364, 1977.]

A síntese do receptor de LDL está ela própria sujeita a regulação por retroalimentação. Os estudos de fibroblastos em cultura mostraram que, *quando o colesterol está presente em quantidades abundantes dentro da célula, não ocorre síntese de novos receptores de LDL, de modo que a captação de mais colesterol das LDL do plasma fica bloqueada*. O gene para o receptor de LDL, à semelhança daquele para a redutase, é regulado pela SREBP, que se liga a um elemento de regulação de esterol, que controla a taxa de síntese de mRNA.

A ausência do receptor de LDL leva ao desenvolvimento de hipercolesterolemia e aterosclerose

Os estudos pioneiros de Brown e Goldstein sobre a *hipercolesterolemia familiar revelaram* a importância fisiológica do receptor de LDL. As concentrações totais de colesterol e de LDL no sangue estão acentuadamente elevadas nesse distúrbio genético, que resulta de uma mutação em um único *locus* autossômico. Nos homozigotos, o nível de colesterol no plasma alcança tipicamente 680 mg dl^{-1} em comparação com 300 mg dl^{-1} nos heterozigotos (os resultados dos exames

laboratoriais são frequentemente expressos em miligramas por decilitro, o que corresponde a miligramas por 100 mililitros). Um valor de < 200 mg dl^{-1} é considerado desejável, porém muitas pessoas apresentam níveis mais elevados. *Na hipercolesterolemia familiar, o colesterol deposita-se em vários tecidos, devido à concentração elevada de colesterol LDL no plasma*. Nódulos de colesterol, denominados *xantomas*, são proeminentes na pele e nos tendões. A oxidação do excesso de LDL no sangue, formando LDL oxidada (oxLDL) é de importância particular. A oxLDL é captada por células do sistema imune, denominadas macrófagos, que ficam ingurgitados, formando células espumosas. Essas células espumosas ficam retidas nas paredes dos vasos sanguíneos e contribuem para a formação de placas ateroscleróticas, que provocam estreitamento arterial e levam à ocorrência de ataques cardíacos (Figura 26.23). Com efeito, *a maioria dos homozigotos morre de doença arterial coronariana na infância*. A doença nos heterozigotos (1 em 500 indivíduos) tem uma evolução clínica mais leve e mais variável.

O defeito molecular na maioria dos casos de hipercolesterolemia familiar consiste na ausência ou deficiência de receptores funcionais de LDL. Foram identificadas mutações do receptor que comprometem cada um dos estágios da via de endocitose. Os homozigotos praticamente não têm nenhum receptor funcional de LDL, enquanto os heterozigotos apresentam cerca da metade da quantidade normal. Em consequência, a entrada de LDL no fígado e em outras células está prejudicada, resultando em níveis aumentados de LDL no plasma. Além disso, menor quantidade de IDL entra nas células hepáticas, visto que a entrada de IDL também é mediada pelo receptor de LDL. Em consequência, a IDL permanece no sangue por mais tempo na hipercolesterolemia familiar, e maior quantidade é convertida em LDL, em comparação com os indivíduos normais. Todas as consequências deletérias da ausência ou da deficiência do receptor de LDL podem ser atribuídas aos níveis elevados resultantes de colesterol LDL no sangue.

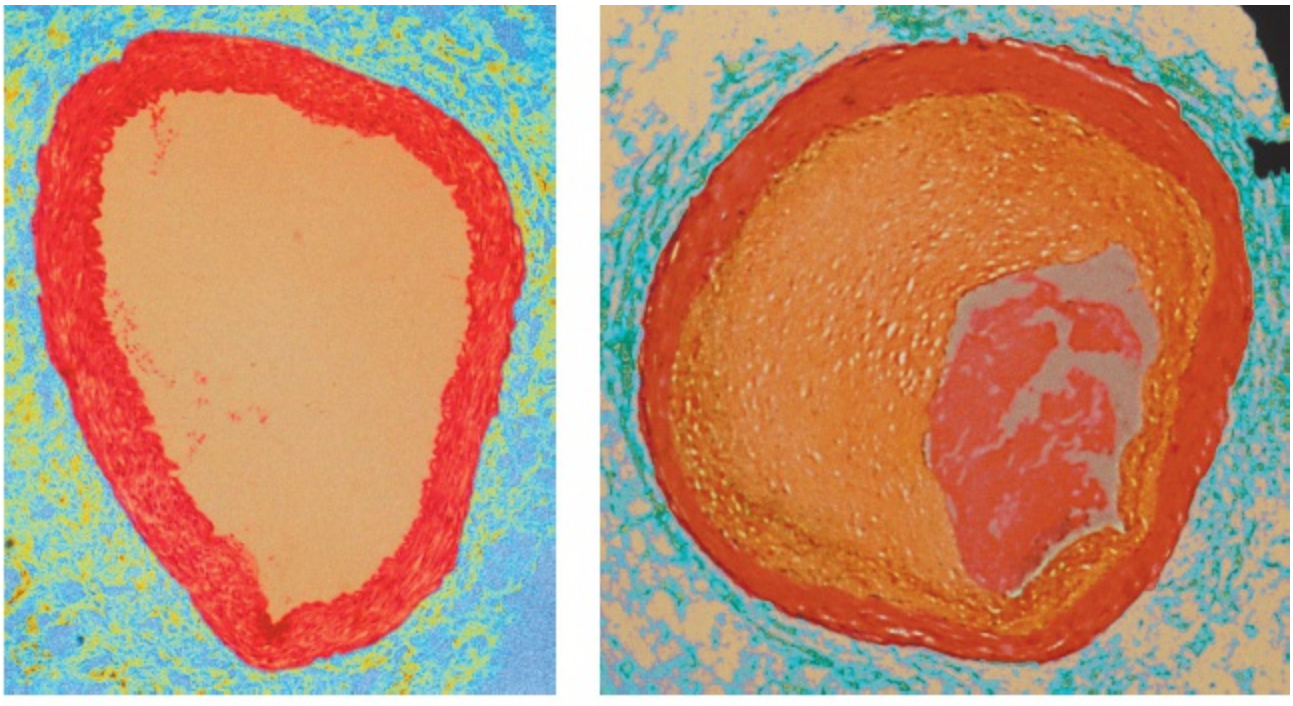


Figura 26.23 Efeitos do excesso de colesterol. Corte transversal de (**A**) uma artéria normal e (**B**) uma artéria ocluída por uma placa rica em colesterol. [SPL/Photo Researchers.]

A ocorrência de mutações no receptor de LDL impede a liberação de LDL e resulta em destruição dos receptores

Uma classe de mutações que provoca hipercolesterolemia familiar resulta na produção de receptores que têm dificuldade em liberar a sua carga de LDL. Examinaremos inicialmente a constituição do receptor. O receptor de LDL humano é uma glicoproteína de 160 kDa, que é composta de seis tipos diferentes de domínios (Figura 26.24A). A região aminoterminal do receptor, que constitui o sítio de ligação da LDL, consiste em sete domínios LA homólogos, sendo os domínios 4 e 5 de maior importância para a ligação da LDL. Um segundo tipo de domínio é homólogo àquele encontrado no fator de crescimento da epiderme (EGF). Esse domínio é repetido três vezes, e, entre a segunda e a terceira repetições, existe uma estrutura em hélice, que consiste em seis domínios semelhantes a lâminas. Essa parte do receptor é crucial para a liberação da LDL no endossomo. O quarto domínio, que é muito rico em resíduos de serina e treonina, contém açúcares com ligação *O*. Esses oligossacarídios funcionam como suportes para manter o receptor em extensão a partir da membrana, de modo que o domínio de ligação de LDL seja acessível à LDL. O quinto tipo de domínio consiste em 22 resíduos hidrofóbicos que atravessam a membrana plasmática, de um lado ao outro. O sexto domínio final consiste em 50 resíduos e emerge no lado citoplasmático da membrana, onde controla a interação do receptor com depressões revestidas e participa da endocitose.

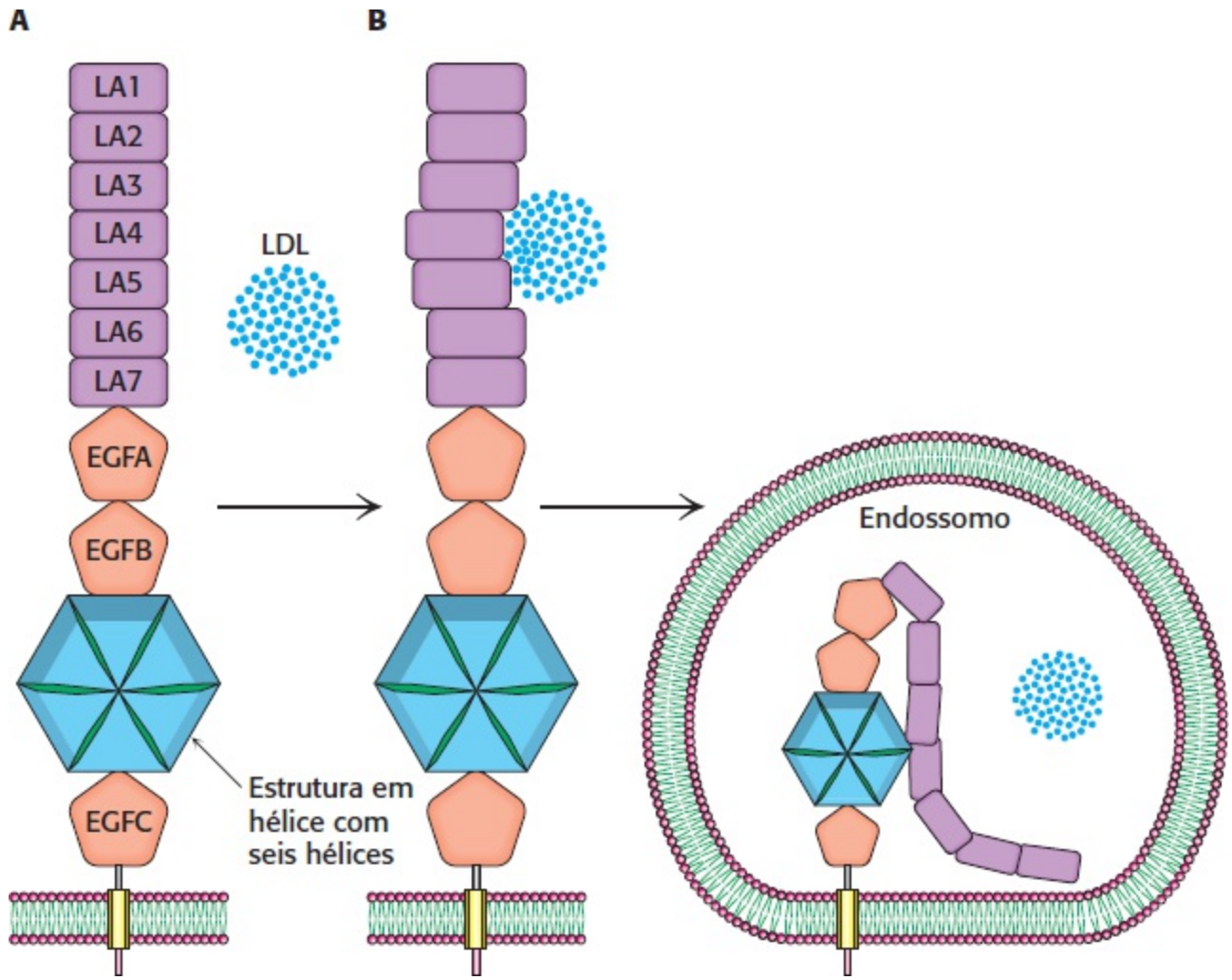


Figura 26.24 O receptor de LDL libera a LDL no endossomo. A. Representação esquemática da estrutura de domínios do receptor de LDL. **B**. No endossomo, a estrutura aberta do receptor é transformada em uma estrutura fechada, resultando na liberação da LDL no endossomo. [De I. D. Campbell, *Biochem. Soc. Trans*. 31 (pt. 6p): 1107-1114, 2003, Fig. 1A.]

Como o receptor de LDL abandona a sua carga ao entrar no endossomo? O receptor existe em dois estados interconversíveis: um estado estendido ou aberto, capaz de ligar a LDL, e um estado fechado, que resulta na liberação da LDL no endossomo. O receptor mantém o seu estado aberto enquanto se encontra na membrana plasmática, ao ligar a LDL e em todo o seu percurso até o endossomo. A conversão do estado aberto no estado fechado ocorre com a sua exposição ao ambiente ácido do endossomo (Figura 26.24B). Três módulos contíguos, LA7, EGFA e EGFB, posicionam rigidamente o módulo em hélice para facilitar o deslocamento da LDL ao se formar o estado fechado. Em pH neutro, os resíduos de aspartato das lâminas da hélice formam pontes de hidrogênio que ligam cada lâmina ao restante da estrutura da hélice. A exposição ao ambiente do endossomo de pH baixo faz com que as estruturas em hélice interajam com o domínio de ligação da LDL. Essa interação desloca a LDL, que é então digerida pelo lisossomo. Em circunstâncias normais, o receptor retorna à membrana plasmática para ligar-se mais uma vez à LDL. A importância desse processo é ressaltada pelo fato de que mais da metade das mutações pontuais que resultam em hipercolesterolemia familiar se devem a rupturas no processo de interconversão entre os estados aberto e fechado. Essas mutações resultam em falha na liberação da carga de LDL e perda do receptor por degradação.

A HDL parece proteger contra a arteriosclerose

Embora os eventos que levam à aterosclerose ocorram rapidamente na hipercolesterolemia familiar, observa-se uma sequência similar de eventos em indivíduos que desenvolvem aterosclerose ao longo de várias décadas. Em particular, a formação de células espumosas e placas constituem um evento particularmente perigoso. A HDL e a sua função no retorno do colesterol ao fígado parecem ser importantes ao atenuar essas circunstâncias potencialmente fatais.

A HDL tem diversas propriedades antiaterogênicas, incluindo inibição da oxidação das LDL, porém a sua propriedade mais bem caracterizada consiste na remoção do colesterol das células, particularmente dos macrófagos. Anteriormente, assinalamos que a HDL recupera o colesterol de outros tecidos no corpo e o devolve ao fígado para ser excretado na forma de bile ou nas fezes. Esse transporte, denominado *transporte reverso do colesterol*, é de suma importância no que concerne aos macrófagos. De fato, quando esse transporte falha, os macrófagos transformam-se em células espumosas e facilitam a formação de placas. Os macrófagos que coletam o colesterol das LDL normalmente transportam o colesterol para as partículas de HDL. Quanto maior a quantidade de HDL, mais prontamente esse transporte ocorre e menor é a probabilidade de transformação dos macrófagos em células espumosas. Presumivelmente, esse importante transporte reverso de colesterol é responsável pela observação de que os níveis mais altos de HDL conferem proteção contra a aterosclerose. Com efeito, esforços estão sendo feitos para desenvolver fármacos que aumentem os níveis de HDL no sangue.

A importância do transporte reverso de colesterol é ilustrado pela ocorrência de mutações que inativam uma das proteínas de transporte de colesterol nos macrófagos. Esse transporte é facilitado por membros da classe ABC de proteínas de transporte (ver Figura 13.7) presentes nas membranas dos macrófagos. A perda da atividade da proteína de transporte de colesterol ABAC1 resulta em uma condição muito rara, denominada *doença de Tangier*, que se caracteriza por deficiência de HDL, acúmulo de colesterol nos macrófagos e aterosclerose prematura.

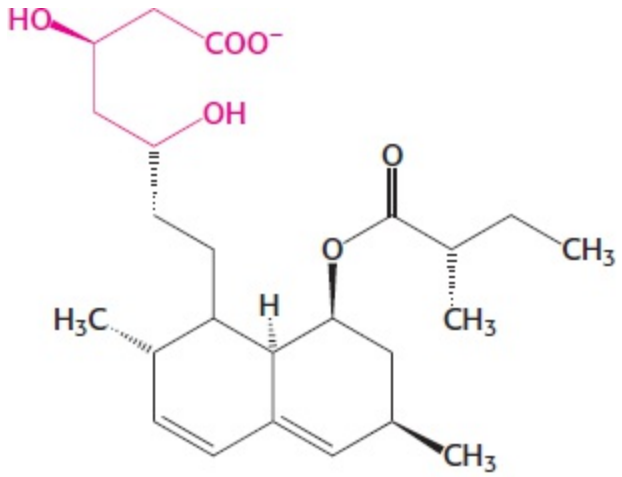
Outra propriedade antiaterogênica das HDL resulta da associação de uma esterase sérica, a *paraoxanase*, com as HDL. A paraoxanase tem a capacidade de destruir a oxLDL, explicando parte

da capacidade das HDL de proporcionar uma proteção contra a doença coronariana.

O controle clínico dos níveis de colesterol pode ser compreendido em nível bioquímico

A hipercolesterolemia familiar homozigota só pode ser tratada com transplante de fígado. Dispõe-se de um tratamento geralmente mais aplicável para os heterozigotos e outros indivíduos com níveis elevados de colesterol. *A meta consiste em reduzir a quantidade de colesterol no sangue, estimulando o único gene normal a produzir uma quantidade de receptores de LDL maior do que o habitual*. Já foi assinalado que a produção de receptores de LDL é controlada pelas necessidades de colesterol da célula. A estratégia terapêutica é privar a célula de fontes já disponíveis de colesterol. Quando há necessidade de colesterol, a quantidade de mRNA do receptor de LDL aumenta, e são encontradas maiores quantidades de receptores na superfície das células. Esse estado pode ser induzido por uma abordagem em dois níveis. Em primeiro lugar, a reabsorção de sais biliares a partir do intestino é inibida. Os sais biliares são derivados do colesterol que promovem a absorção do colesterol e dos lipídios da alimentação. Em segundo lugar, a síntese *de novo* de colesterol é bloqueada.

A reabsorção da bile é impedida pela administração oral de polímeros de carga positiva, como a colestiramina, que se ligam aos sais biliares de carga negativa, mas que não são absorvidos. A síntese de colesterol pode ser efetivamente bloqueada por uma classe de compostos denominada *estatinas*. Um exemplo bem conhecido desse tipo de composto é a lovastatina, também denominada Mevacor® (Figura 26.25). Esses compostos são potentes inibidores competitivos (K_i = 1 nM) da HMG-CoA redutase, que constitui o ponto de controle essencial na via de biossíntese. Os níveis plasmáticos de colesterol declinam em 50% em muitos pacientes com o uso de lovastatina e inibidores da reabsorção de sais biliares. A lovastatina e outros inibidores da HMG-CoA redutase são amplamente usados para diminuir os níveis plasmáticos de colesterol em indivíduos que apresentam aterosclerose, a principal causa de morte nas sociedades industrializadas. O desenvolvimento das estatinas como fármacos efetivos será descrito com mais detalhes no Capítulo 36.



Lovastatina

Figura 26.25 Lovastatina, um inibidor competitivo da HMG-CoA redutase. A parte da estrutura que se assemelha à porção 3-hidroxi-3-metilglutaril é mostrada em vermelho.

26.4 Os derivados importantes do colesterol incluem sais biliares e hormônios esteroides

Embora o colesterol por si só seja bem conhecido como fator que contribui para o desenvolvimento de doença cardíaca, os seus metabólitos – os hormônios esteroides – também aparecem frequentemente com destaque nas notícias. De fato, o uso abusivo de hormônios esteroides parece ser tão proeminente nos noticiários de esportes quanto qualquer atleta famoso. Além dos hormônios esteroides, o colesterol é o precursor de duas outras moléculas importantes: os sais biliares e a vitamina D. Inicialmente, discutiremos os sais biliares, que são moléculas fundamentais para a captação de lipídios na alimentação.

Sais biliares. Os *sais biliares* são derivados polares do colesterol. Esses compostos são *detergentes* altamente efetivos, visto que eles contêm regiões tanto polares quanto apolares. Os sais biliares são sintetizados no fígado, armazenados e concentrados na vesícula biliar e então liberados no intestino delgado. Os sais biliares, que representam o principal componente da bile, *solubilizam os lipídios da alimentação*. A solubilização aumenta a área de superfície efetiva dos lipídios, com duas consequências: (1) maior área de superfície fica exposta à ação digestiva das lipases e (2) os lipídios são mais prontamente absorvidos pelo intestino. Os sais biliares também constituem os principais produtos de degradação do colesterol. Os sais biliares, isto é, o glicocolato, o principal sal biliar, e o taurocolato, são apresentados na Figura 26.26.

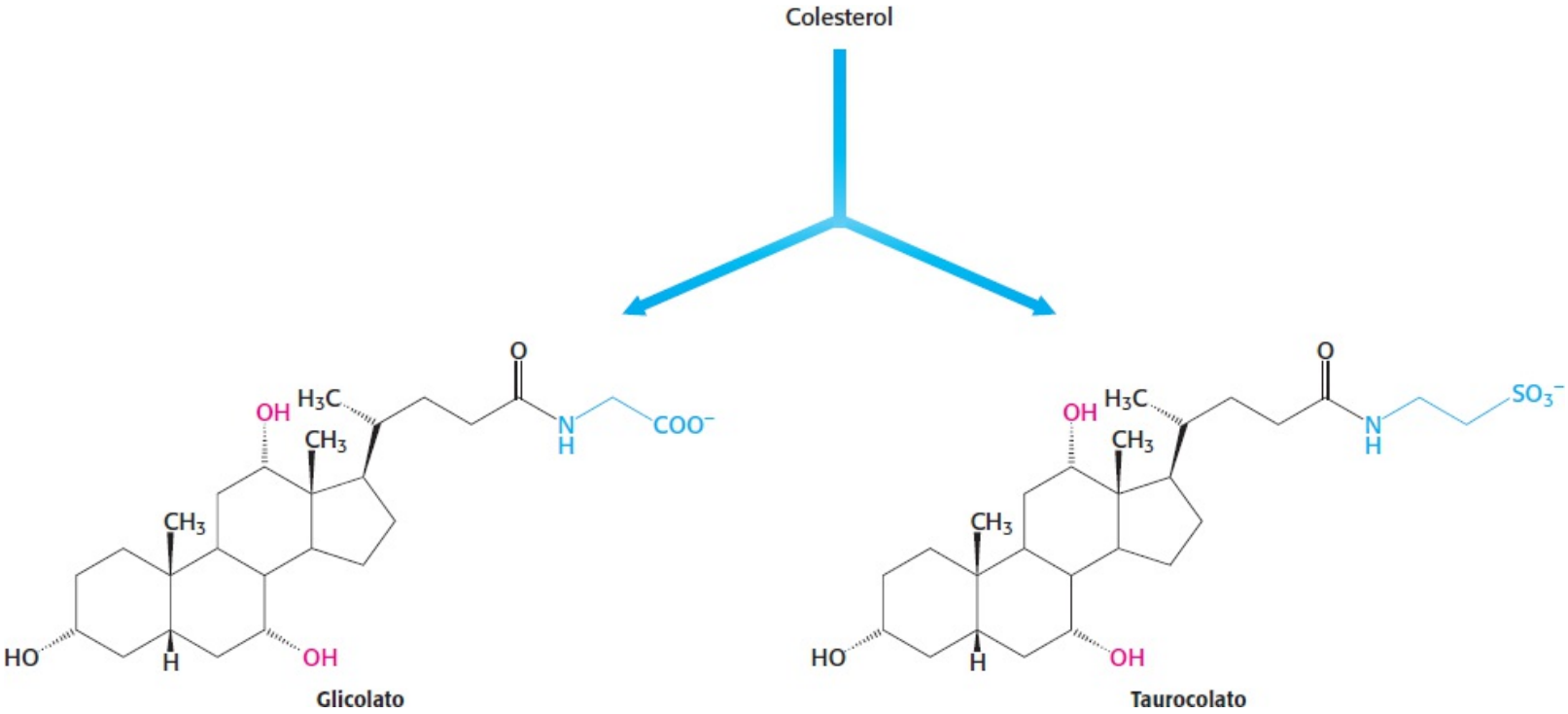


Figura 26.26 Síntese de sais biliares. Os grupos OH em vermelho são acrescentados ao colesterol, assim como os grupos mostrados em azul.

Hormônios esteroides. O colesterol é o precursor de cinco classes principais de *hormônios esteroides*: os progestógenos, os glicocorticoides, os mineralocorticoides, os androgênios e os estrogênios (Figura 26.27). Esses hormônios são moléculas de sinalização poderosas, que regulam inúmeras funções do organismo. A *progesterona, um progestógeno*, prepara o revestimento do útero

para implantação de um óvulo. A progesterona também é essencial para a manutenção da gestação. Os *androgênios* (como a *testosterona*) são responsáveis pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias masculinas, enquanto os *estrogênios* (como o *estradiol*) são necessários para o desenvolvimento das características sexuais secundárias femininas. Os estrogênios, juntamente com a progesterona, também participam no ciclo ovariano. Os glicocorticoides (como o *cortisol*) promovem a gliconeogênese e a formação de glicogênio, aumentam a degradação dos lipídios e das proteínas e inibem a resposta inflamatória. Eles capacitam os animais a responder ao estresse; com efeito, a ausência de glicocorticoides pode ser fatal. Os *mineralocorticoides* (principalmente a *aldosterona*) atuam nos túbulos distais dos rins e aumentam a reabsorção de Na^+ e a excreção de K^+ e H^+, levando a um aumento do volume sanguíneo e da pressão arterial. Os principais locais de síntese dessas classes de hormônios são o corpo lúteo, para os progestógenos; os testículos, para os androgênios; os ovários, para os estrogênios; e o córtex da suprarrenal, para os glicocorticoides e os mineralocorticoides.

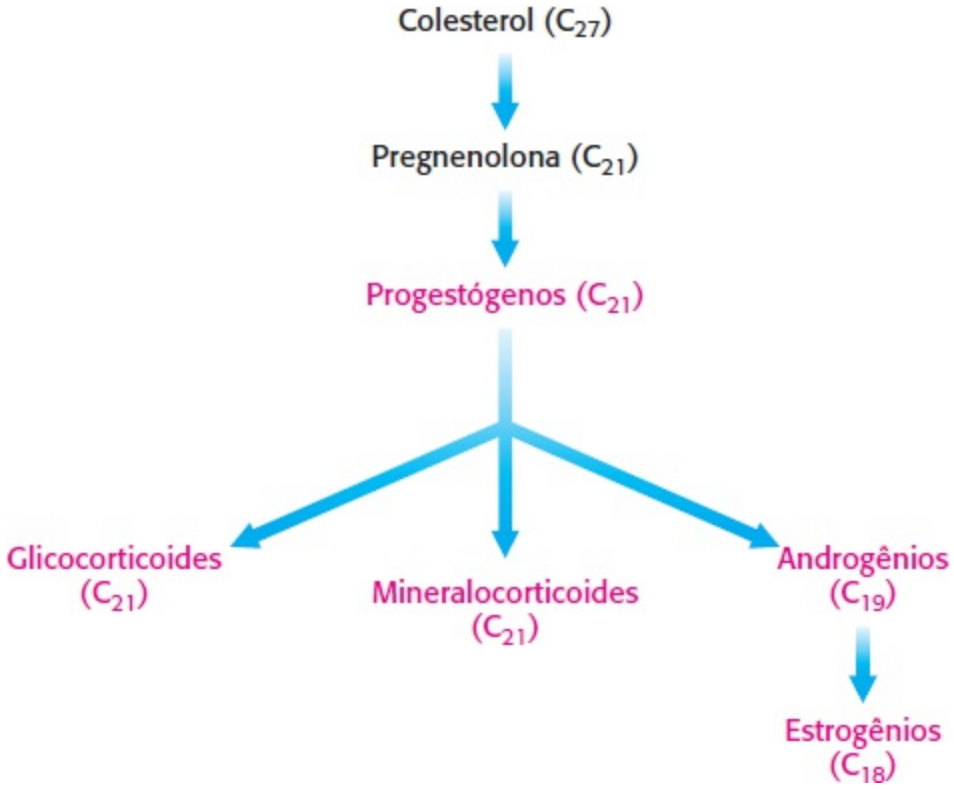


Figura 26.27 Relações de biossíntese entre as classes de hormônios esteroides e o colesterol.

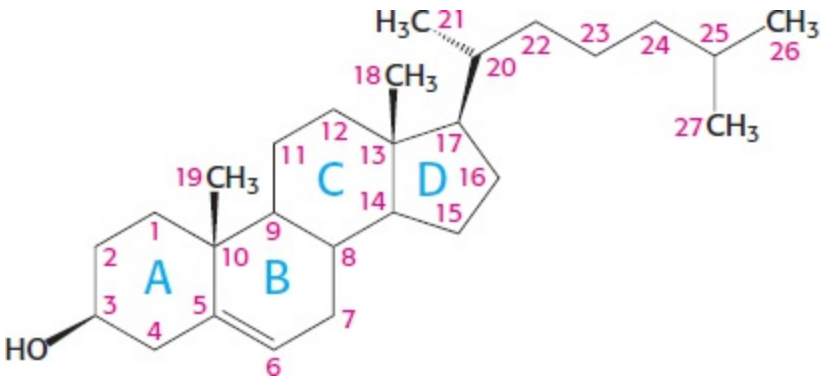
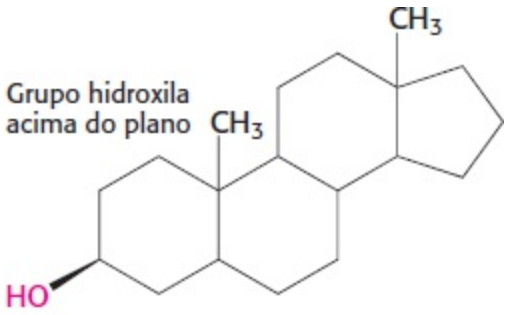
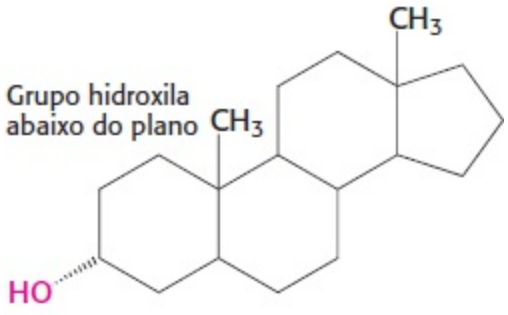


Figura 26.28 Numeração dos carbonos do colesterol. Esquema de numeração para os átomos de carbono no colesterol e em outros esteroides.

Os hormônios esteroides ligam-se a moléculas receptoras e as ativam; essas moléculas servem então como fatores de transcrição para regular a expressão gênica (Seção 32.2). Essas pequenas moléculas semelhantes são capazes de exercer efeitos amplamente diversos, visto que a existência de diferenças estruturais discretas entre elas possibilita interações com moléculas receptoras específicas.



3β-hidroxi

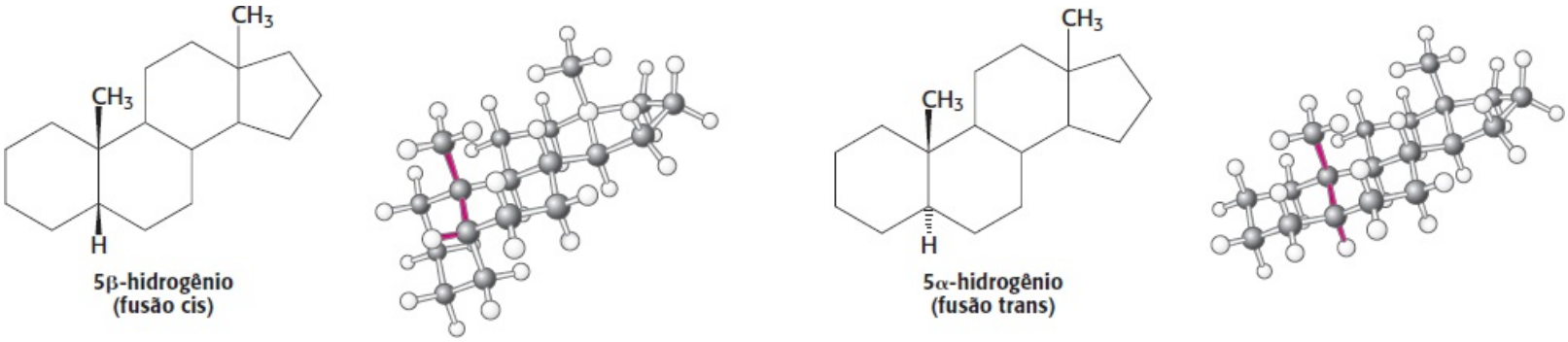


3α-hidroxi

As letras identificam os anéis de esteroides, enquanto os números identificam os átomos de carbono

Os átomos de carbono nos esteroides são numerados, conforme indicado para o colesterol na Figura 26.28. Os anéis nos esteroides são designados pelas letras A, B, C e D. O colesterol contém dois grupos metila angulares: o grupo metila C-19 está ligado ao C-10, enquanto o grupo metila C-18 está ligado ao C-13. Os grupos metila C-18 e C-19 do colesterol estão situados *acima* do plano que contém os quatro anéis. Um substituinte localizado acima do plano é designado como de *orientação* β, enquanto um substituinte abaixo do plano tem *orientação* α.

Se um átomo de hidrogênio estiver ligado ao C-5, pode ter uma orientação α ou β. Os anéis esteroides A e B estão fundidos em uma conformação *trans* se o hidrogênio em C-5 tiver *orientação* α, e *cis* se tiver uma *orientação* β. A ausência de uma letra grega para o átomo de hidrogênio em C-5 no núcleo esteroide implica uma fusão trans. O átomo de hidrogênio em C-5 tem orientação α em todos os hormônios esteroides que contêm um átomo de hidrogênio nessa posição. Em contrapartida, os sais biliares apresentam um átomo de hidrogênio de orientação β em C-5. Por conseguinte, *a fusão cis é característica dos sais biliares, enquanto a fusão trans caracteriza todos os hormônios esteroides que possuem um átomo de hidrogênio em C-5*. Uma fusão trans produz uma estrutura quase planar, enquanto uma fusão cis produz uma estrutura encurvada.



Os esteroides são hidroxilados por mono-oxigenases do citocromo P450 que utilizam NADPH e O_2

O acréscimo de grupos OH desempenha um papel importante na síntese de colesterol a partir do esqualeno e na conversão do colesterol em hormônios esteroides e sais biliares. Todas essas hidroxilações necessitam de *NADPH* e O_2. O átomo de oxigênio do grupo hidroxila incorporado provém do O_2, e não da H_2O. Enquanto um átomo de oxigênio da molécula de O_2 vai para o substrato, o outro é reduzido a água. As enzimas que catalisam essas reações são denominadas *mono-oxigenases* (ou *oxigenases de função mista*). Convém lembrar que uma mono-oxigenase também participa na hidroxilação de aminoácidos aromáticos (Seção 23.5).

$$RH = O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow ROH + H_2O + NADP^+$$

A *hidroxilação exige a ativação do oxigênio*. Na síntese de hormônios esteroides e de sais biliares, a ativação ocorre por membros da família do *citocromo P450*, uma família de citocromos que absorve luz ao máximo em 450 nm, quando complexada *in vitro* com monóxido de carbono exógeno. Essas proteínas (cerca de 50 kDa) ancoradas a membranas contêm um heme como grupo prostético. O oxigênio é ativado por meio de sua ligação ao átomo de ferro no grupo heme.

Como as reações de hidroxilação promovidas pelas enzimas do citocromo P450 são reações de oxidação, é surpreendente, à primeira vista, que elas também consumam o redutor NADPH. O NADPH transfere seus elétrons de alto potencial para uma flavoproteína, que os transfere, um de cada vez, para a *adrenodoxina*, uma proteína contendo ferro não hêmico. A adrenodoxina transfere um elétron para reduzir a forma férrica (Fe^{3+}) do P450 à forma ferrosa (Fe^{2+}) (Figura 26.29).

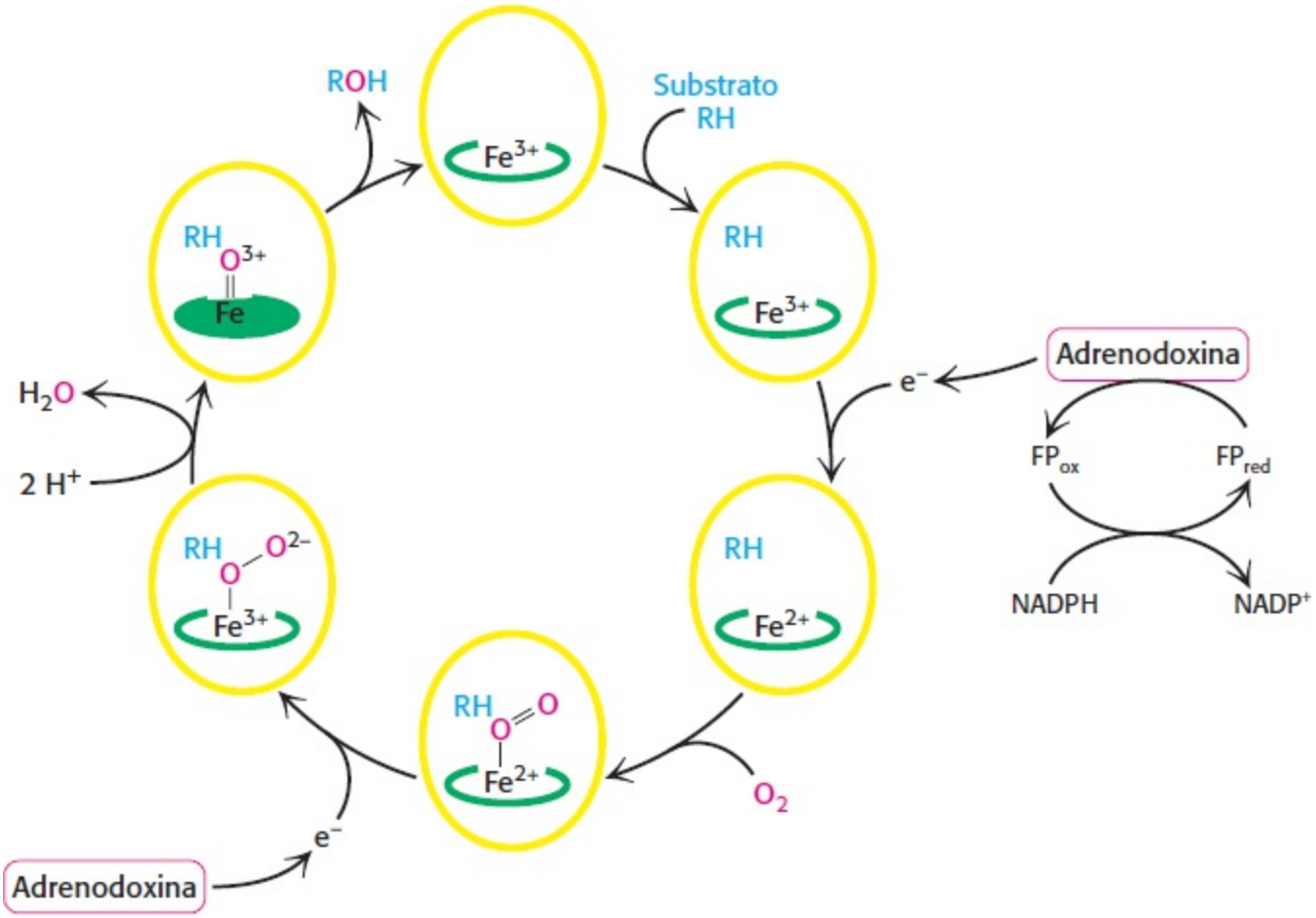


Figura 26.29 Mecanismo do citocromo P450. Essas enzimas ligam-se ao O_2 e utilizam um átomo de oxigênio para hidroxilar seus substratos.

Sem a adição desse elétron, o citocromo P450 não se liga ao oxigênio. É importante lembrar que apenas a forma ferrosa (Fe^{2+}) da mioglobina liga-se ao oxigênio (Seção 7.1). A ligação de O_2 ao heme é seguida da aceitação de um segundo elétron da adrenodoxina. A entrada desse segundo elétron leva à clivagem da ligação O—O. Um dos átomos de oxigênio é então protonado e liberado como água. O átomo de oxigênio remanescente forma um intermediário ferril Fe=O altamente reativo. Esse intermediário retira um átomo de hidrogênio do substrato RH, formando R•. Esse radical livre transitório captura o grupo OH do átomo de ferro, formando ROH, o produto hidroxilado, e determinando o retorno do átomo de ferro ao estado férrico.

O sistema do citocromo P450 é disseminado e desempenha uma função protetora

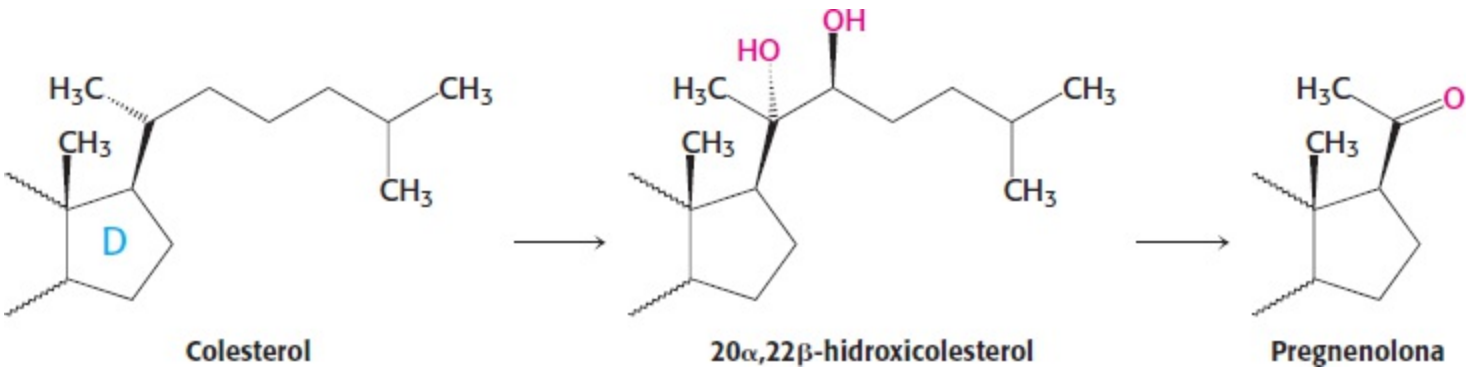
O sistema do citocromo P450, que, nos mamíferos, está localizado principalmente no retículo endoplasmático do fígado e do intestino delgado, também é importante na *desintoxicação de substâncias estranhas* (compostos xenobióticos). Por exemplo, a hidroxilação do fenobarbital, um barbitúrico, *aumenta a sua solubilidade* e *facilita a sua excreção*. De modo semelhante, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos que são ingeridos pela ingestão de água contaminada são hidroxilados pelo citocromo P450, fornecendo locais para conjugação com unidades altamente polares (p.ex., glicuronato ou sulfato), que aumentam acentuadamente a solubilidade da molécula aromática modificada. Uma das funções mais relevantes do sistema do citocromo P450 para os seres humanos consiste em seu papel no metabolismo de fármacos, como a cafeína e o ibuprofeno (Capítulo 36). Alguns membros do sistema do citocromo P450 também metabolizam o etanol (Seção

27.6). A duração de ação de muitos medicamentos depende de sua taxa de inativação pelo sistema P450. Apesar de seu papel protetor geral na remoção de substâncias químicas estranhas, a ação do sistema P450 nem sempre é benéfica. *Alguns dos carcinógenos mais poderosos são gerados a partir de compostos inócuos pelo sistema P450 in vivo*, no processo de *ativação metabólica*. Nos vegetais, o sistema do citocromo P450 desempenha um papel na síntese de compostos tóxicos, bem como dos pigmentos das flores.

O sistema do citocromo P450 é uma superfamília ubíqua de mono-oxigenases, que está presente em vegetais, animais e procariotos. O genoma humano codifica mais de 50 membros da família, enquanto o genoma da planta *Arabidopsis* codifica mais de 250 membros. Todos os membros dessa grande família surgiram por duplicação gênica, seguida de subsequente divergência, que gerou uma gama de especificidade de substratos. A especificidade dessas enzimas está codificada em regiões delimitadas da estrutura primária, e a especificidade de substrato de membros estreitamente relacionados é definida, com frequência, por apenas alguns resíduos críticos ou até mesmo por um único aminoácido.

A pregnenolona, um precursor de muitos outros esteroides, é formada a partir do colesterol pela clivagem de sua cadeia lateral

Os hormônios esteroides contêm 21 átomos de carbono ou menos, enquanto o colesterol contém 27. Por conseguinte, o primeiro estágio na síntese de hormônios esteroides consiste na remoção de uma unidade de seis carbonos da cadeia lateral do colesterol para formar a *pregnenolona*. A cadeia lateral do colesterol é hidroxilada em C-20 e, a seguir, em C-22, e a ligação entre esses átomos de carbono é então clivada pela *desmolase*. Nessa notável oxidação de seis elétrons, são consumidas três moléculas de NADPH e três moléculas de O_2.



A progesterona e os corticosteroides são sintetizados a partir da pregnenolona

A *progesterona* é sintetizada a partir da pregnenolona em duas etapas. O grupo 3-hidroxila da pregnenolona é oxidado a um grupo 3-ceto, e a dupla ligação Δ^5 é isomerizada a uma dupla ligação Δ^4 (Figura 26.30). O *cortisol*, o principal glicocorticoide, é sintetizado a partir da progesterona por hidroxilações em C-17, C-21 e C-11; o C-17 precisa ser hidroxilado antes da hidroxilação do C-21, enquanto o C-11 pode ser hidroxilado em qualquer estágio. As enzimas que catalisam essas hidroxilações são altamente específicas, conforme demonstrado por alguns distúrbios hereditários. A etapa inicial na síntese de *aldosterona*, o principal mineralocorticoide, consiste na hidroxilação da progesterona em C-21. A desoxicorticosterona resultante é hidroxilada em C-11. A oxidação do

grupo metila angular C-18 a aldeído produz então a aldosterona.

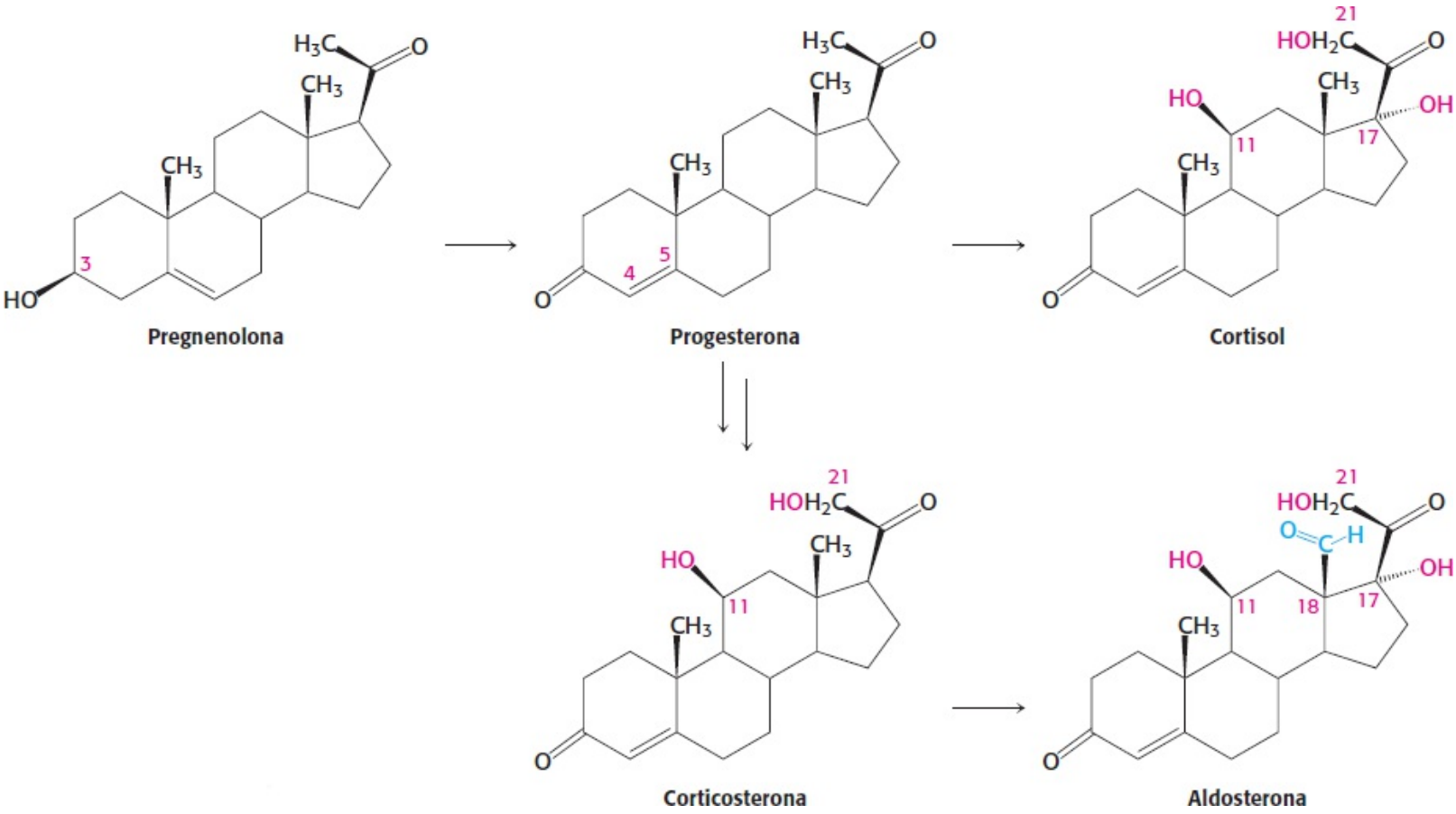


Figura 26.30 Vias de formação de progesterona, cortisol e aldosterona.

Os androgênios e os estrogênios são sintetizados a partir da pregnenolona

Os androgênios e os estrogênios também são sintetizados a partir da pregnenolona por meio do intermediário progesterona. Os androgênios contêm 19 átomos de carbono. A síntese de androgênios começa com a hidroxilação da progesterona em C-17 (Figura 26.31). A cadeia lateral, constituída de C-20 e C-21, é então clivada, produzindo *androstenediona*, um androgênio. A *testosterona*, outro androgênio, é formada pela redução do grupo 17-ceto da androstenediona. A testosterona, por meio de suas ações no cérebro, é de suma importância no desenvolvimento do comportamento sexual masculino. É também importante para a manutenção dos testículos e o desenvolvimento da massa muscular. Em virtude dessa última atividade, a testosterona é designada como *esteroide anabolizante*. A testosterona é reduzida pela *5α-redutase*, produzindo *di-hidrotestosterona* (DHT), um poderoso androgênio embrionário que estimula o desenvolvimento e a diferenciação do fenótipo masculino. Os estrogênios são sintetizados a partir dos androgênios pela perda do grupo metila angular C-19 e pela formação de um anel A aromático. A *estrona*, um estrogênio, deriva da androstenediona, enquanto o *estradiol*, outro estrogênio, é formado a partir da testosterona. A formação do anel A aromático é catalisada pela enzima do citocromo P450, a *aromatase*.

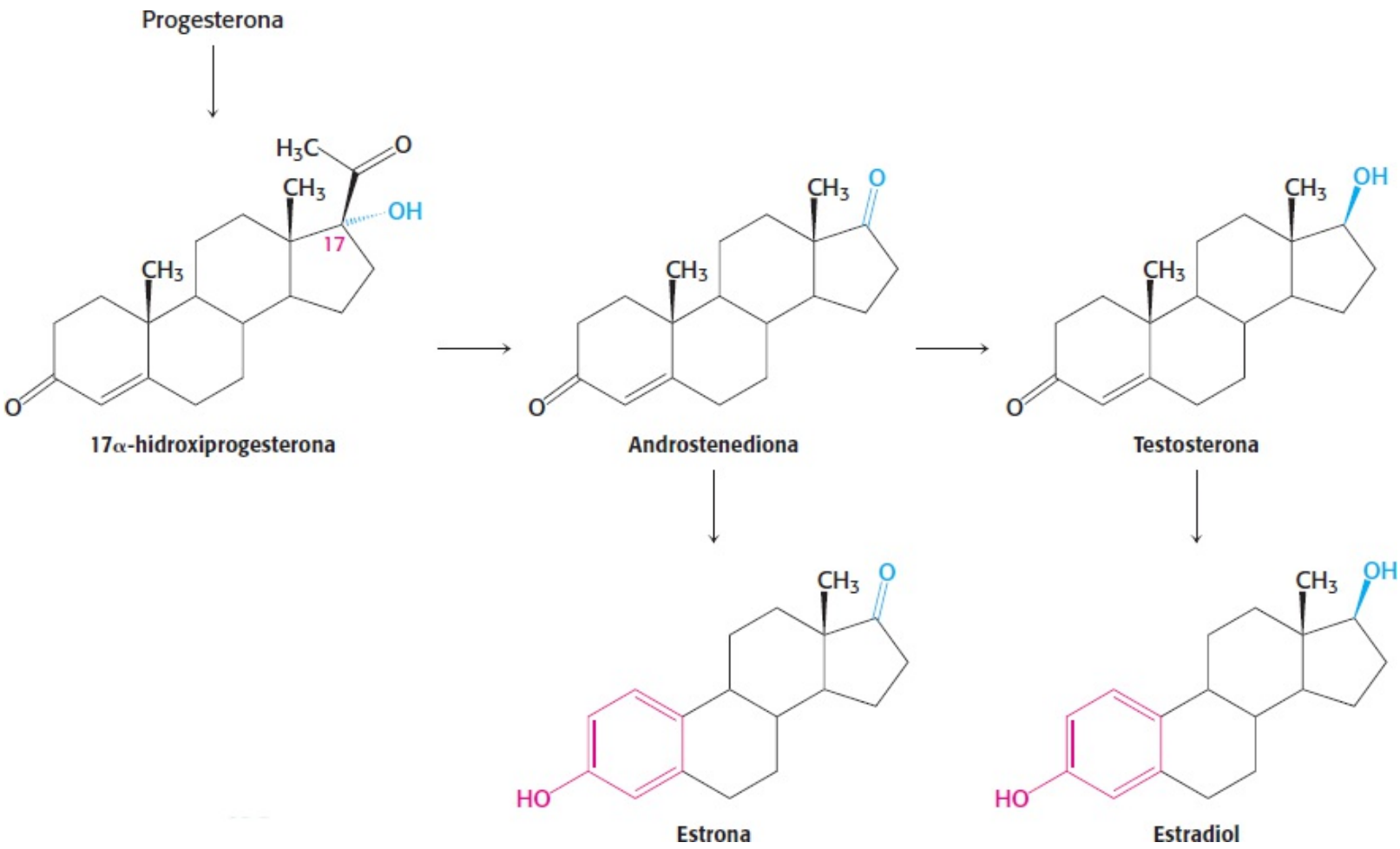
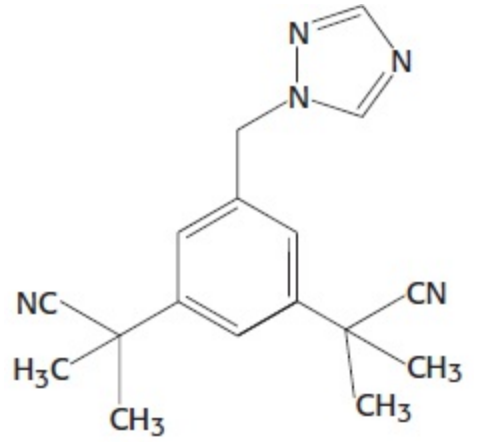
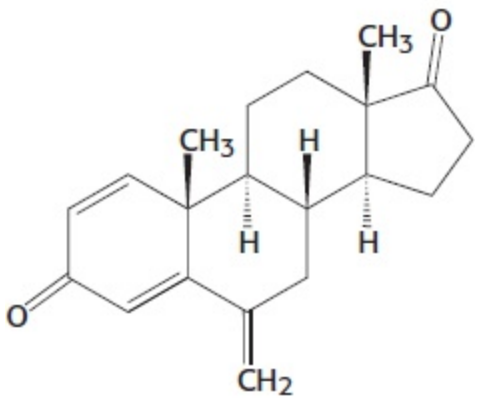


Figura 26.31 Vias de formação dos androgênios e dos estrogênios.

Como os cânceres de mama e de ovário frequentemente dependem da presença de estrogênios para o seu crescimento, os inibidores da aromatase são frequentemente utilizados como tratamento para esses cânceres. O anastrozol é um inibidor competitivo da enzima, enquanto o exemestano é um inibidor suicida, que modifica e inativa de modo covalente a enzima.



Anastrozol



Exemestano

A vitamina D provém do colesterol pela atividade de ruptura de anel da luz

O colesterol também é o precursor da vitamina D, que desempenha um papel essencial no controle do metabolismo do cálcio e do fósforo. *O 7-desidrocolesterol* (*provitamina D_3*) *é fotolisado pela luz ultravioleta do sol a pré-vitamina D_3, que isomeriza espontaneamente a vitamina D_3* (Figura 26.32). A vitamina D_3 (colecalciferol) é convertida em *calcitriol* (1,25-di-hidroxicolecalciferol), o hormônio ativo, por reações de hidroxilação no fígado e nos rins. Embora não seja um esteroide, a vitamina D atua de modo análogo. A vitamina liga-se a um receptor estruturalmente semelhante aos receptores de esteroides, formando um complexo que atua como fator de transcrição, regulando a expressão gênica.

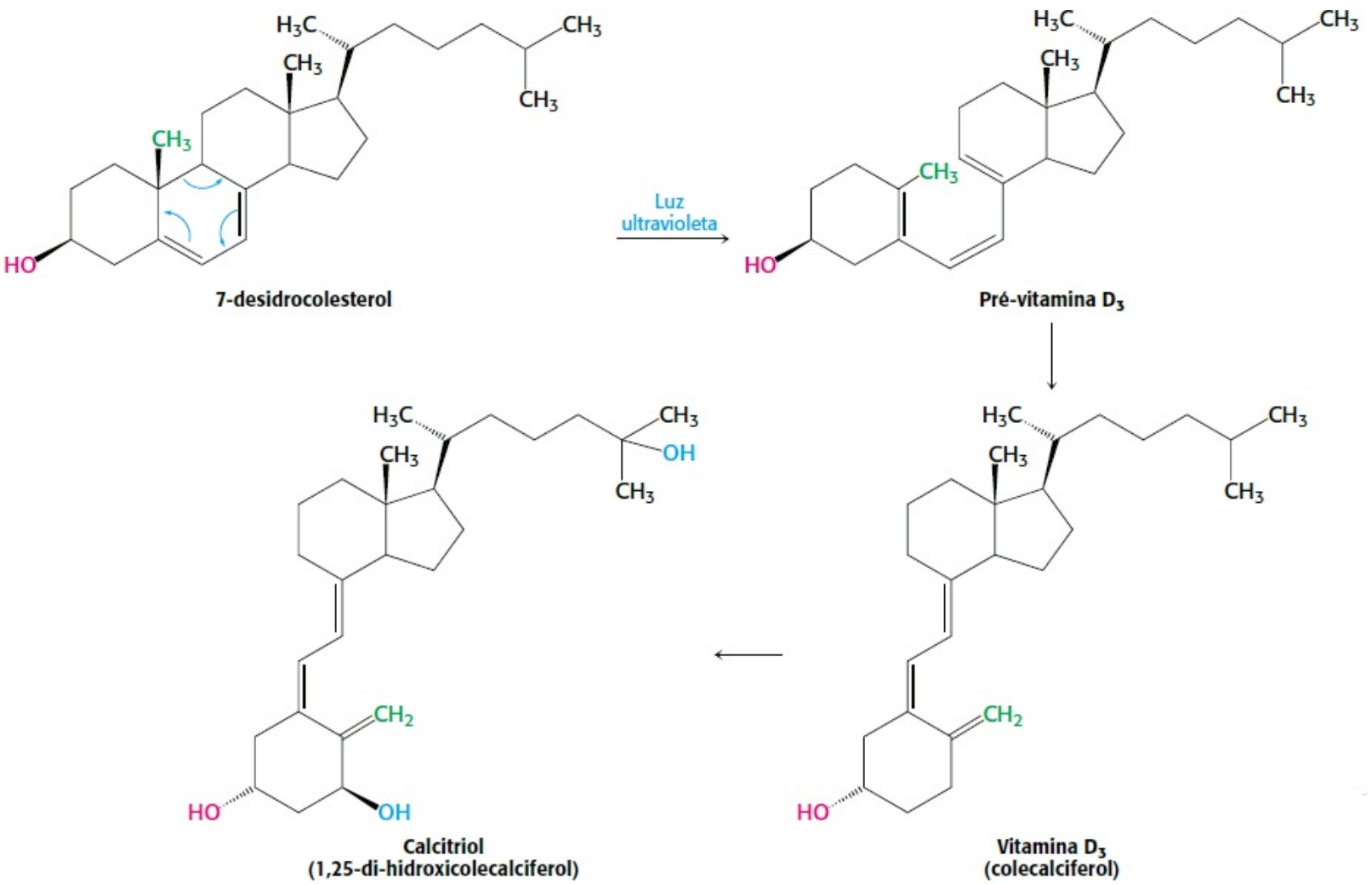


Figura 26.32 Síntese de vitamina D. Via de conversão do 7-desidrocolesterol em vitamina D_3 e, a seguir, em calcitriol, o hormônio ativo.

A deficiência de vitamina D na infância produz *raquitismo*, uma doença caracterizada por calcificação inadequada da cartilagem e do osso. O raquitismo era tão comum na Inglaterra do século 17 que foi designado como "doença infantil dos ingleses". O 7-desidrocolesterol na pele dessas crianças não era fotolisado a pré-vitamina D_3, devido à presença de pouca luz solar na maior parte dos meses do ano. Além disso, a sua alimentação fornecia pouca vitamina D, visto que a maioria dos alimentos de ocorrência natural tem baixo conteúdo dessa vitamina. Os óleos de fígado de peixe representam uma notável exceção. O óleo de fígado de bacalhau, odiado por gerações de crianças em virtude de seu sabor desagradável, era usado no passado como fonte rica de vitamina D. Hoje em dia, as fontes alimentares mais confiáveis de vitamina D são os alimentos enriquecidos. Por exemplo, o leite é enriquecido até um nível de 400 unidades internacionais por aproximadamente 1 l (cerca de 10 μg por litro). O aporte diário recomendado de vitamina D é de 200 unidades internacionais até os 50 anos de idade, quando essa dose aumenta com a idade. Nos adultos, a deficiência de vitamina D leva a amolecimento e enfraquecimento dos ossos, uma condição denominada *osteomalacia*. A ocorrência de osteomalacia em mulheres muçulmanas, que se vestem de modo que apenas os olhos sejam expostos à luz solar, constitui uma notável advertência de que a vitamina D é necessária para os adultos, assim como para as crianças.

As pesquisas realizadas nesses últimos anos indicam que a vitamina D pode desempenhar um papel bioquímico muito mais amplo do que a simples regulação do metabolismo ósseo. O músculo parece constituir um alvo de ação da vitamina D. No músculo, a vitamina D parece afetar diversos

processos bioquímicos, cujo efeito final consiste em aumento do desempenho muscular. Os estudos realizados também sugerem que a vitamina D impeça o desenvolvimento de doença cardiovascular, diminua a incidência de uma variedade de cânceres e proteja contra doenças autoimunes, incluindo o diabetes melito. Além disso, a deficiência de vitamina D parece ser mais comum do que se pensava. Nos EUA, 90% dos negros e muitos hispânicos e asiáticos apresentam níveis sanguíneos insuficientes de vitamina D. Essa pesquisa recente sobre a vitamina D mostra mais uma vez a natureza dinâmica das pesquisas bioquímicas. A vitamina D, cujo papel bioquímico se acreditava estar bem estabelecido, oferece agora novas fronteiras de pesquisa biomédica.

Resumo

26.1 O fosfatidato é um intermediário comum na síntese dos fosfolipídios e triacilgliceróis

O fosfatidato é formado por acilações sucessivas do glicerol 3-fosfato pela acil-CoA. A hidrólise de seu grupo fosforila, seguida de acilação, produz um triacilglicerol. O CDP-diacilglicerol, o intermediário ativado na síntese *de novo* de vários fosfolipídios, é formado a partir do fosfatidato e CTP. A unidade fosfatidil ativada é então transferida para o grupo hidroxila de um álcool polar, como o inositol, formando um fosfolipídio, como o fosfatidilinositol. Nos mamíferos, a fosfatidiletanolamina é formada pela CDP etanolamina e diacilglicerol. A fosfatidiletanolamina é metilada pela *S*-adenosilmetionina, formando fosfatidilcolina. Nos mamíferos, esse fosfoglicerídio também pode ser sintetizado por uma via que utilize a colina da alimentação. A CDP-colina é o intermediário ativado dessa via.

Os esfingolipídios são sintetizados a partir da ceramida, que é formado por acilação da esfingosina. Os gangliosídios são esfingolipídios que contêm uma unidade oligossacarídica que apresenta pelo menos um resíduo de *N*-acetilneuraminato ou um ácido siálico relacionado. São sintetizados pela adição sequencial de açúcares ativados, como UDP-glicose, a ceramida.

26.2 O colesterol é sintetizado a partir da acetil-coenzima A em três estágios

O colesterol é um esteroide componente das membranas animais e um precursor dos hormônios esteroides. A etapa comprometida em sua síntese é a formação de mevalonato a partir da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (derivada da acetil-CoA e a acetoacetil-Coa). O mevalonato é convertido em isopentenil pirofosfato (C_5), que se condensa com o seu isômero, o dimetilalil pirofosfato (C_5), formando geranil pirofosfato (C_{10}). A adição de uma segunda molécula de isopentenil pirofosfato produz farnesil pirofosfato (C_{15}), que se condensa com outra molécula de farnesil pirofosfato para formar o esqualeno (C_{30}). Esse intermediário cicliza a lanosterol (C_{30}), que é modificado para produzir colesterol (C_{27}).

26.3 A regulação complexa da biossíntese de colesterol ocorre em vários níveis

No fígado, a síntese de colesterol é regulada por alterações na quantidade e na atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase. A transcrição do gene, a tradução do mRNA e a degradação da enzima são estritamente controladas. Além disso, a atividade da redutase é regulada por fosforilação.

Os triacilgliceróis exportados pelo intestino são transportados por quilomícrons e, a seguir,

hidrolisados por lipases que revestem os capilares dos tecidos-alvo. O colesterol e outros lipídios em quantidades acima das necessárias para o fígado são exportados na forma de lipoproteína de densidade muito baixa. Após liberar o seu conteúdo de triacilgliceróis no tecido adiposo e em outros tecidos periféricos, a VLDL é convertida em lipoproteína de densidade intermediária e, a seguir, em lipoproteína de baixa densidade. As IDL e LDL transportam ésteres de colesteril, principalmente colesteril linoleato. O fígado e as células de tecidos periféricos captam a LDL por endocitose mediada por receptor. O receptor de LDL, uma proteína que se estende de um lado a outro da membrana plasmática da célula-alvo, liga-se à LDL e medeia a sua entrada na célula. A ausência do receptor de LDL na forma homozigota da hipercolesterolemia familiar provoca aumento acentuado dos níveis plasmáticos de colesterol LDL e depósito de colesterol nas paredes dos vasos sanguíneos, o que, por sua vez, pode resultar em ataques cardíacos na infância. A apolipoproteína B, uma proteína muito grande, é um componente estrutural essencial dos quilomícrons, das VLDL e das LDL. As lipoproteínas de alta densidade transportam o colesterol dos tecidos periféricos para o fígado.

26.4 Os derivados importantes do colesterol incluem sais biliares e hormônios esteroides

Além dos sais biliares, que facilitam a digestão dos lipídios, cinco classes importantes de hormônios esteroides têm a sua origem a partir do colesterol: os progestógenos, os glicocorticoides, os mineralocorticoides, os androgênios e os estrogênios. As hidroxilações por mono-oxigenases do citocromo P450 que utilizam NADPH e O_2 desempenham um papel importante na síntese de hormônios esteroides e sais biliares a partir do colesterol. As enzimas do citocromo P450, que representam uma grande superfamília, também participam na desintoxicação de fármacos e outras substâncias estranhas.

A pregnenolona (C_{21}) é um intermediário essencial na síntese de esteroides. Esse esteroide é formado pela cisão da cadeia lateral do colesterol. A progesterona (C_{21}), que é sintetizada a partir da pregnenolona, é o precursor do cortisol e da aldosterona. A hidroxilação da progesterona e a clivagem de sua cadeia lateral produzem a androstenediona, um androgênio (C_{19}). Os estrogênios (C_{18}) são sintetizados a partir dos androgênios pela perda de um grupo metila angular e pela formação de anel A aromático. A vitamina D, que é importante no controle do metabolismo do cálcio e do fósforo, é formada a partir de um derivado do colesterol pela ação da luz.

Palavras-chave

3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase) (p. 774)
3-isopentenil pirofosfato (p. 774)
ceramida (p. 770)
cerebrosídio (p. 770)
citidina difosfodiacilglicerol (CDP-diacilglicerol) (p. 767)
colesterol (p. 773)
endocitose mediada por receptor (p. 781)
esfingolipídio (p. 769)
fosfatidato (p. 766)

fosfolipídio (p. 767)
gangliosídio (p. 770)
hormônios esteroides (p. 786)
lipoproteína de alta densidade (HDL) (p. 779)
lipoproteína de baixa densidade (LDL) (p. 779)
mevalonato (p. 773)
mono-oxigenase do citocromo P450 (p. 788)
partículas de lipoproteínas (p. 778)
pregnenolona (p. 789)
proteína de ligação do elemento regulador de esterol (SREBP) (p. 776)
sais biliares (p. 785)
transporte reverso do colesterol (p. 784)
triacilglicerol (p. 767)

Questões

1. *Diferentes papéis*. Descreva os papéis do glicerol 3-fosfato, do fosfatidato e do diacilglicerol na síntese de triacilgliceróis e fosfolipídios.

2. *Suprimentos necessários*. Como surge o glicerol 3-fosfato necessário para a síntese de fosfatidato?

3. *Produzindo gordura*. Escreva uma equação balanceada para a síntese de um triacilglicerol, começando a partir do glicerol e ácidos graxos.

4. *Fazendo um fosfolipídio*. Escreva uma equação balanceada para a síntese de fosfatidiletanolamina pela via *de novo*, começando com a etanolamina, o glicerol e ácidos graxos.

5. *Necessidades de ATP*. Quantas moléculas com alto potencial de transferência de fosforila são necessárias para a síntese de fosfatidiletanolamina a partir da etanolamina e diacilglicerol? Suponha que a etanolamina seja o componente ativado.

6. *Identificando diferenças*. Faça a diferenciação entre esfingomielina, cerebrosídio e gangliosídio.

7. *Contando as maneiras*. Em princípio, existem apenas três maneiras de produzir um fosfolipídio com glicerol. Descreva essas três vias.

8. *Doadores ativados*. Qual é o reagente ativado em cada uma das seguintes biossínteses?

(a) Fosfatidilinositol a partir do inositol

(b) Fosfatidiletanolamina a partir da etanolamina

(c) Ceramida a partir da esfingosina

(d) Esfingomielina a partir da ceramida

(e) Cerebrosídio a partir da ceramida

(f) Gangliosídio G_{M1} a partir do gangliosídio G_{M2}

(g) Farnesil pirofosfato a partir do geranil pirofosfato

9. *Sem DAG, sem TAG*. Qual seria o efeito de uma mutação que diminuísse a atividade da ácido fosfatídico fosfatase?

10. *A Lei dos Três Estágios*. Quais são os três estágios necessários para a síntese de colesterol?

11. *Muitas regulações a seguir*. Descreva de modo sucinto os mecanismos de regulação da biossíntese de colesterol.

12. *Marcadores reveladores*. Qual é a distribuição do marcador isotópico no colesterol sintetizado a partir de cada um dos seguintes precursores?

(a) Mevalonato marcado com ^{14}C em seu átomo de carbono carboxílico

(b) Malonil-CoA marcada com ^{14}C em seu átomo de carbono carboxílico

13. *Precocemente e em demasia*. O que é hipercolesterolemia familiar e quais as suas causas?

14. *Hipercolesterolemia familiar*. Várias classes de mutações do receptor de LDL foram identificadas como causas dessa doença. Suponha que você tenha amostras de células de pacientes com diferentes mutações, um anticorpo específico para o receptor de LDL que possa ser visualizado com um microscópio eletrônico e acesso a esse microscópio eletrônico. Que diferenças na distribuição do anticorpo você poderia esperar encontrar nas células de diferentes pacientes?

15. *Conversa durante o café da manhã*. Você e a sua amiga estão tomando café da manhã juntos. Enquanto está comendo, a sua amiga lê o rótulo da caixa de cereais e depara-se com a seguinte declaração: "O colesterol desempenha uma função benéfica em seu corpo, produzindo células, hormônios e tecidos." Sabendo que você está estudando bioquímica, ela pergunta se isso faz sentido. O que você responde?

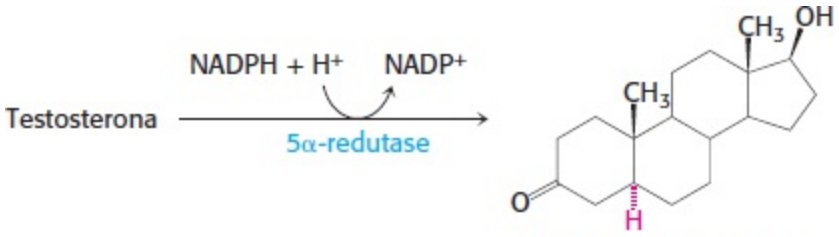
16. *Uma boa coisa*. O que são estatinas? Qual a sua função farmacológica?

17. *Uma boa coisa em demasia*. O desenvolvimento de uma "superestatina" capaz de inibir toda a atividade da HMG-CoA redutase seria um fármaco útil? Explique.

18. *Edição do RNA*. Uma versão encurtada (apo B-48) da apolipoproteína B é formada pelo intestino, enquanto a proteína de comprimento integral (apo B-100) é sintetizada pelo fígado. Um códon de glutamina (CAA) é modificado em um códon de terminação. Proponha um mecanismo simples para essa modificação.

19. *Um meio de entrada*. Descreva o processo de endocitose mediada por receptor utilizando a LDL como exemplo.

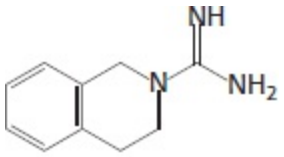
20. *Inspiração para o planejamento de fármacos*. Algumas ações dos androgênios são mediadas pela di-hidrotestosterona, que é formada pela redução da testosterona. Esse toque final é catalisado por uma 5α-redutase dependente de NADPH.



5α-di-hidrotestosterona

Indivíduos do sexo masculino com cromossomos XY com um defeito genético dessa redutase nascem com um trato urogenital interno masculino, porém com genitália externa predominantemente feminina. Essas pessoas são habitualmente criadas como meninas. Na puberdade, elas se masculinizam, devido à elevação dos níveis de testosterona. Os testículos desses homens com deficiência de redutase são normais, porém a próstata permanece pequena. Como essa informação poderia ser utilizada para o planejamento de um fármaco capaz de tratar a *hipertrofia prostática benigna*, uma consequência comum do processo de envelhecimento normal nos homens? A maioria dos homens com mais de 55 anos de idade tem algum grau de aumento da próstata, o que leva frequentemente à obstrução urinária.

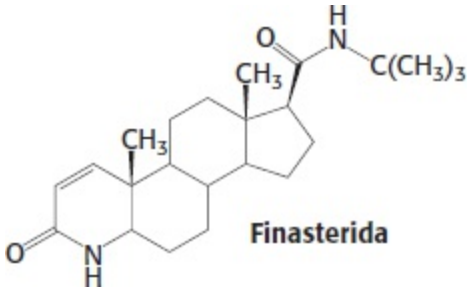
21. *Idiossincrasias para medicamentos*. A debrisoquina, um agente bloqueador beta-adrenérgico, tem sido usada no tratamento da hipertensão. A dose ideal varia acentuadamente (20 a 400 mg/dia) em uma população de pacientes. A urina da maioria dos pacientes em uso do medicamento contém um nível elevado de 4-hidroxidebrisoquina. Todavia, os mais sensíveis ao fármaco (cerca de 8% do grupo estudado) excretam a debrisoquina e uma quantidade muito pequena do derivado 4-hidroxi. Proponha uma base molecular para essa idiossincrasia do medicamento. Por que é preciso ter cautela ao prescrever outros medicamentos a pacientes que sejam muito sensíveis à debrisoquina?



Debrisoquina

22. *Remoção de substâncias odorantes*. Muitas moléculas odorantes são altamente hidrofóbicas e concentram-se no epitélio olfatório. Causariam um sinal persistente, independente de sua concentração no ambiente, se não fossem rapidamente modificadas. Proponha um mecanismo para converter substâncias odorantes hidrofóbicas em derivados hidrossolúveis passíveis de rápida eliminação.

23. *Dificuldades de desenvolvimento*. Propecia (finasterida) é um esteroide sintético que funciona como inibidor competitivo e específico da 5α-redutase, a enzima responsável pela síntese de di-hidrotestosterona a partir da testosterona.



Finasterida

Hoje em dia, esse fármaco é amplamente usado para retardar o desenvolvimento do padrão masculino de queda de cabelo. As mulheres grávidas são aconselhadas a evitar a manipulação desse medicamento. Por que é de importância vital que as gestantes evitem qualquer contato com Propecia®?

24. *Consequências do estilo de vida*. Os seres humanos e a planta *Arabidopsis* evoluíram a partir do mesmo ancestral distante que possuía um pequeno número de genes do citocromo P450. Os seres humanos apresentam aproximadamente 50 desses genes, enquanto *Arabidopsis* tem mais de 250. Proponha um papel para o grande número de isoenzimas P450 nas plantas.

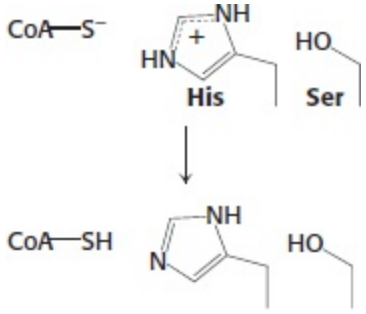
25. *Medicina personalizada*. O sistema do citocromo P450 metaboliza numerosos fármacos clinicamente úteis. Embora todos os seres humanos tenham o mesmo número de genes para o sistema do citocromo P450, existem polimorfismos individuais que alteram a especificidade e a eficiência das proteínas codificadas pelos genes. Como o conhecimento dos polimorfismos individuais poderia ser clinicamente útil?

26. *Crise das abelhas*. Em 2006, houve uma súbita e inesperada extinção de colônias de abelhas comuns em todos os EUA. A mortandade foi economicamente significativa, visto que um terço da alimentação humana provém de plantas polinizadas por insetos, e as abelhas são responsáveis por 80% da polinização. Em outubro de 2006, foi relatada a sequência do genoma das abelhas. Interessante que foi constatado que o genoma contém um número bem menor de genes do citocromo P450 do que os genomas de outros insetos. Sugira como a extinção das abelhas e a escassez de genes do citocromo P450 podem estar relacionadas.

27. *Deixe o sol brilhar*. Em nível bioquímico, a vitamina D funciona como um hormônio esteroide (ver Capítulo 31). Por conseguinte, é algumas vezes designada como esteroide honorário. Por que a vitamina D não é um verdadeiro esteroide?

Questões sobre mecanismo

28. *Interferência de um fosfato*. Durante a reação global catalisada pela HMG-CoA redutase, um resíduo de histidina protona um tiolato de coenzima A, CoA–S^- gerado em uma etapa anterior.



Um resíduo de serina próximo pode ser fosforilado por uma quinase dependente de AMP, resultando em perda da atividade. Proponha uma explicação para a inibição da atividade da enzima pela fosforilação do resíduo de serina.

29. *Desmetilação*. Com frequência, as metilaminas são desmetiladas por enzimas do citocromo P450. Proponha um mecanismo para a formação de metilamina a partir de dimetilamina, catalisada

pelo citocromo P450. Qual é o outro produto?

Questões Integração de capítulos

30. *Semelhanças*. Compare o papel da CTP na síntese de fosfoglicerídio com o papel da UTP na síntese de glicogênio.

31. *Segure firme ou você poderá ser atirado ao citoplasma*. Muitas proteínas são modificadas pela ligação covalente de uma unidade farnesil (C_{15}) ou geranilgeranil (C_{20}) ao resíduo de cisteína carboxiterminal da proteína. Sugira por que essa modificação pode ocorrer.

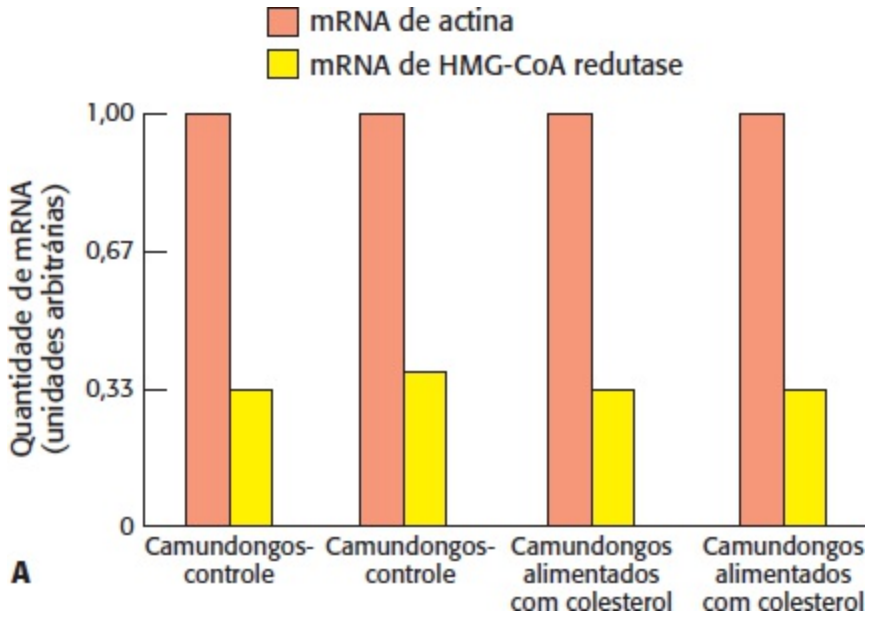
32. *Bifurcação na estrada*. A 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA encontra-se na via de biossíntese do colesterol. Trata-se também de um componente de outra via. Cite essa via. O que determina a via seguida pela 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA?

33. *Exige um sócio do clube*. Como o metabolismo da metionina está relacionado com a síntese de fosfatidilcolina?

34. *Necessidades de ATP*. Explique como a síntese de colesterol depende da atividade da ATP-citrato liase.

Questão de integração de capítulos e interpretação de dados

35. *Alimentação com colesterol*. Foram distribuídos camundongos em quatro grupos, dois dos quais receberam alimentação normal, enquanto os outros dois tiveram uma alimentação rica em colesterol. Em seguida, o mRNA da HMG-CoA redutase e a proteína do fígado foram isolados e quantificados. O gráfico A mostra os resultados do isolamento do mRNA.

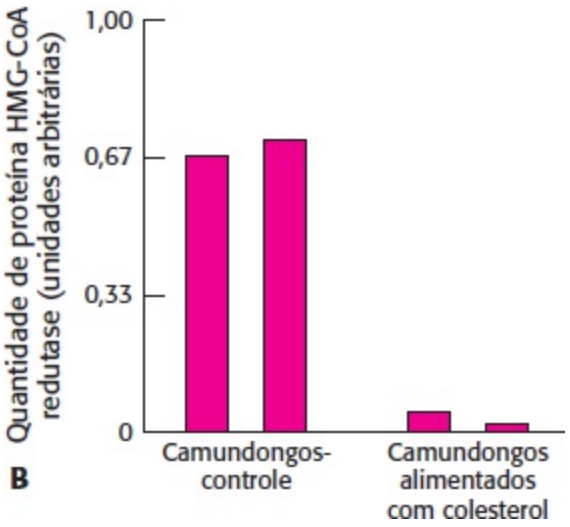


(a) Qual o efeito da alimentação com colesterol sobre a quantidade de mRNA da HMG-CoA redutase?

(b) Qual o propósito de isolar também o mRNA para a proteína actina, que não está sob o controle do elemento regulador de esterol?

A proteína HMG-CoA redutase foi isolada por precipitação com um anticorpo monoclonal dirigido

contra a HMG-CoA redutase. A quantidade de proteína HMG-CoA em cada grupo é mostrada no gráfico B.



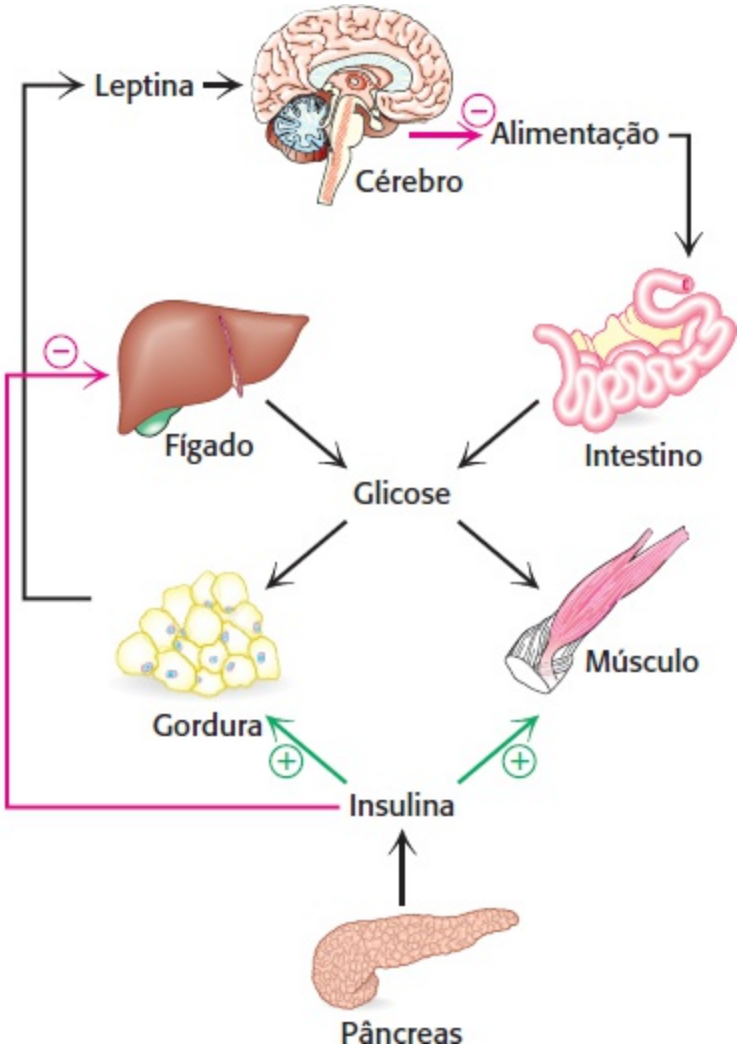
(c) Qual o efeito da alimentação com colesterol sobre a quantidade de proteína HMG-CoA?

(d) Por que esse resultado é surpreendente à luz dos resultados observados no gráfico A?

(e) Sugira possíveis explicações para os resultados apresentados no gráfico B.

Integração do Metabolismo

27



A imagem à esquerda mostra um detalhe de corredores em uma ânfora grega pintada no século 6 a.C. Proezas atléticas como esta e outras aparentemente simples, como a manutenção dos níveis de glicemia, exigem uma integração elaborada do metabolismo. O esquema apresentado à direita mostra os órgãos que desempenham papéis essenciais na integração metabólica que regula os níveis de glicemia durante o exercício físico e em repouso. A insulina e a leptina (secretada pelos adipócitos) são dois dos hormônios que modulam as vias metabólicas de órgãos em todo o corpo, de modo que haja energia adequada disponível para atender às necessidades vitais. [À esquerda, Copyright © The Metropolitan Museum of Art/Art Resource, NY.]

SUMÁRIO

27.1 A homeostasia calórica constitui um meio de regular o peso corporal

27.2 O cérebro desempenha um papel essencial na homeostasia calórica

27.3 O diabetes é uma doença metabólica comum, que frequentemente resulta da obesidade

27.4 O exercício físico altera beneficamente a bioquímica das células

27.5 A ingestão de alimentos e a inanição induzem alterações metabólicas

Até aqui nós analisamos a bioquímica do metabolismo, descrevendo uma via de cada vez. Verificamos como a energia útil é extraída de substratos energéticos e utilizada para acionar reações de biossíntese e vias de transdução de sinais. Nos Capítulos 28 a 30, o estudo das reações de biossíntese será dedicado à síntese de proteínas e de ácidos nucleicos. Entretanto, antes disso, voltaremos, neste capítulo, a examinar as interações bioquímicas em larga escala que constituem a fisiologia dos organismos. De acordo com um tema central da vida – a manipulação da energia – analisaremos a regulação da energia no organismo, que pode ser reduzida a uma pergunta aparentemente simples, mas na verdade muito complexa: Em nível bioquímico, como um organismo sabe quando comer e quando deixar de comer? A capacidade de manter reservas de energia adequadas, porém não excessivas, é denominada *homeostasia calórica*, ou *homeostasia energética*.

Em seguida, examinaremos uma perturbação significativa da homeostasia calórica – a obesidade –, e como esse distúrbio fisiológico afeta a ação da insulina, frequentemente levando ao desenvolvimento de diabetes melito. Então nos concentraremos na análise bioquímica de uma das atividades mais benéficas que os seres humanos podem exercer – o exercício físico – e veremos como esse exercício atenua os efeitos do diabetes melito e como suas diferentes formas utilizam fontes distintas de energia.

Examinaremos também as respostas bioquímicas ao jejum e à inanição, desafios que se encontram na extremidade oposta do espectro fisiológico da obesidade e da superalimentação. Terminaremos o capítulo descrevendo outra perturbação energética bioquímica – o consumo excessivo de álcool.

Já estudamos casos de regulação da energia do organismo quando consideramos as ações da insulina e do glucagon. Convém lembrar que a insulina, que é secretada pelas células β do pâncreas, provoca a remoção da glicose do sangue e estimula a síntese de glicogênio e de lipídios. O glucagon, que é secretado pelas células α do pâncreas, tem efeitos opostos aos da insulina. Ele aumenta os níveis de glicemia ao estimular a degradação do glicogênio e a gliconeogênese. Neste capítulo introduziremos dois hormônios que desempenham papéis fundamentais na homeostasia calórica. A leptina e a adiponectina, que são secretadas pelo tecido adiposo, atuam em conjunto com a insulina para regular a homeostasia calórica.

27.1 A homeostasia calórica constitui um meio de regular o peso corporal

Nessa etapa de nosso estudo da bioquímica, já estamos cientes do fato de que muitas substâncias bioquímicas, mais notavelmente os carboidratos e os lipídios, constituem fontes potenciais de energia. Consumimos essas fontes de energia na forma de alimentos, convertemos a energia em ATP e utilizamos esse ATP para acionar nossas vidas. Como todas as transformações energéticas, o consumo e o gasto de energia são determinados pelas leis de termodinâmica. É importante lembrar que, de acordo com a segunda lei de termodinâmica, a energia não pode ser criada nem destruída. Quando expressa em termos práticos de nossa alimentação,

$$\text{Energia consumida} = \text{energia gasta} + \text{energia armazenada}$$

Essa equação simples tem sérias implicações em termos fisiológicos e para a saúde: de acordo com

a Segunda Lei de Termodinâmica, se consumirmos mais energia do que a que gastamos, desenvolveremos sobrepeso ou obesidade. Em geral, a obesidade é definida como um índice de massa corporal (IMC) superior a 30 kg m^{-2}, enquanto sobrepeso é definido como um IMC de mais de 25 kg m^{-2} (Figura 27.1). Convém lembrar que a gordura em excesso é armazenada nos adipócitos na forma de triacilgliceróis. A quantidade de adipócitos permanece fixa no adulto, de modo que a obesidade resulta em ingurgitamento dos adipócitos. Com efeito, a célula pode aumentar de tamanho em até 1.000 vezes.

Deve-se reconhecer que muitas pessoas, principalmente nos países desenvolvidos, estão se tornando obesas ou já chegaram a esse estado. Nos EUA, a obesidade tornou-se uma epidemia, e quase 30% dos adultos são classificados como obesos. A obesidade é classificada como fator de risco em inúmeras condições patológicas, incluindo diabetes melito, hipertensão e doença cardiovascular (Tabela 27.1). Na maioria dos casos, a causa da obesidade é muito simples: o indivíduo consome mais alimentos do que o necessário, e o excesso de calorias é armazenado na forma de gordura. A base bioquímica das patologias causadas pela obesidade será considerada posteriormente neste capítulo.

Antes de empreendermos uma análise bioquímica dos resultados do excesso de consumo, consideremos, em primeiro lugar, a causa da ocorrência de uma epidemia de obesidade. Há duas explicações para isso. A primeira segue um ponto de vista, comumente defendido, segundo o qual nossos corpos estão programados para armazenar rapidamente o excesso de calorias em tempos de fartura, constituindo uma adaptação evolutiva desde épocas remotas, quando os seres humanos não tinham garantia de encontrar alimentos em quantidades abundantes, como ocorre com muitos de nós hoje em dia. Em consequência, armazenamos calorias como se um jejum fosse começar amanhã; entretanto, esse jejum não ocorre. A segunda explicação possível é a de que não enfrentamos mais os riscos de predação. As evidências indicam que a predação era uma causa comum de morte em nossos ancestrais. Um indivíduo obeso provavelmente teria mais tendência a ser abatido em um grupo de nossos ancestrais do que um indivíduo magro e mais ágil. À medida que o risco de predação foi diminuindo, a magreza tornou-se menos benéfica. Independentemente do motivo pelo qual podemos ter propensão a ganhar peso, essa tendência pode ser anulada pelo comportamento – alimentando-se menos e fazendo mais exercício físico. Entretanto, os estudos genéticos indicam que a tendência à obesidade pode ser altamente hereditária.

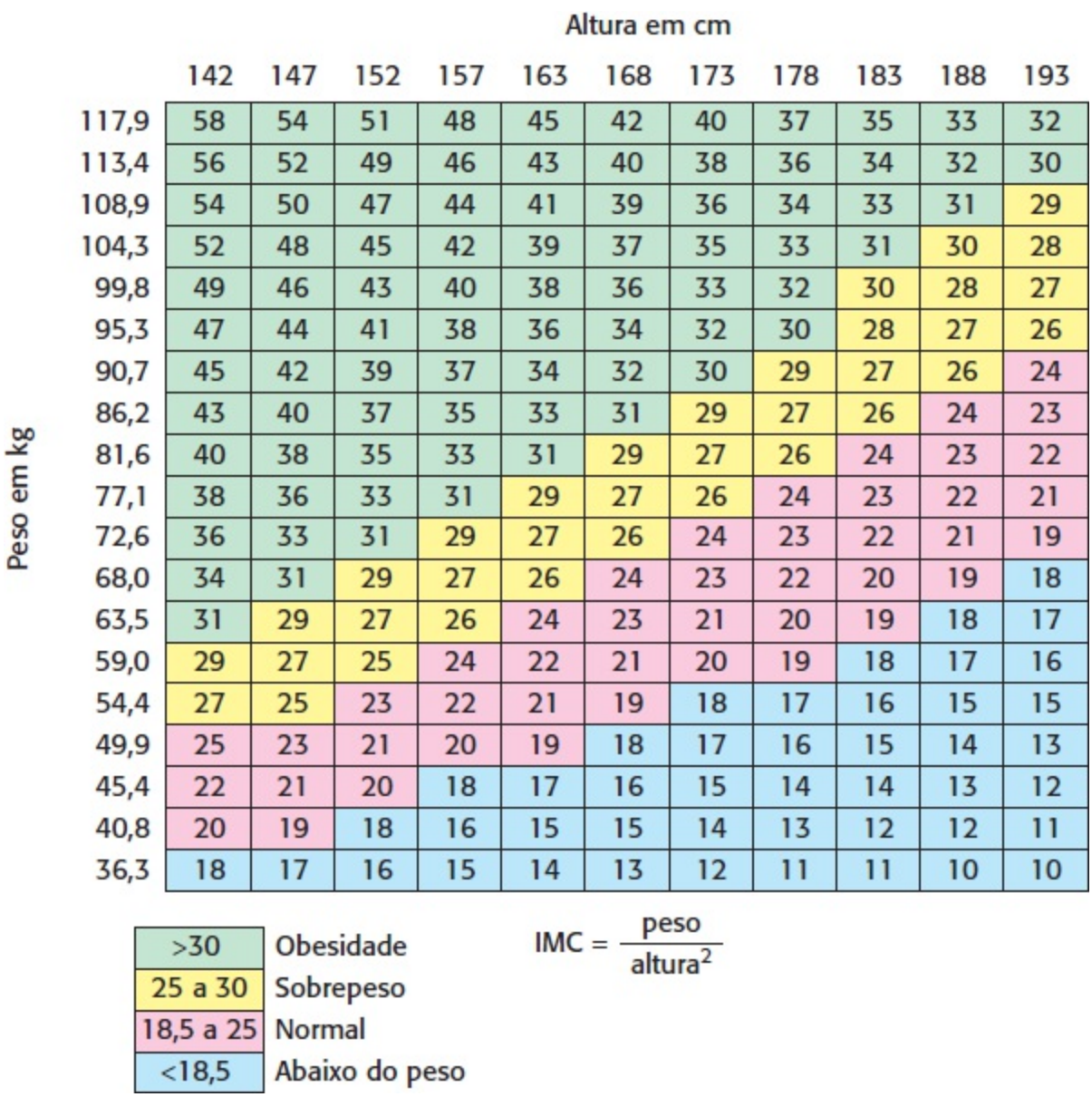


Figura 27.1 Índice de massa corporal (IMC). O IMC de um indivíduo é um indicador confiável de obesidade na maioria das pessoas. [Dados obtidos dos Centers for Disease Control.]

Tão surpreendente quanto a epidemia da obesidade é o fato de que muitas pessoas são capazes de manter um peso corporal aproximadamente constante durante toda a vida adulta. Alguns cálculos simples de uma situação simplificada ilustrarão como esse feito é notável. Considere uma mulher de 54 kg cujo peso não se alterou significativamente entre 25 e 65 anos de idade. Digamos que essa mulher necessite de 2.000 kcal dia^{-1}. No decorrer desses 40 anos, vejamos o que ela terá consumido.

Tabela 27.1 Consequências da obesidade ou do sobrepeso na saúde.

Coronariopatia
Diabetes tipo 2
Câncer (endometrial, de mama e cólon)
Hipertensão (pressão arterial elevada)
Dislipidemia (perturbação do metabolismo dos lipídios (p.ex., níveis elevados de colesterol e triglicerídios)

Acidente vascular encefálico
Doença hepática e da vesícula biliar
Apneia do sono e problemas respiratórios
Osteoartrite (degeneração da cartilagem e do osso subjacente de uma articulação)
Problemas ginecológicos (menstruação anormal, infertilidade)

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention Web site (www.cdc.gov).

$$40 \text{ anos} \times 365 \text{ dias ano}^{-1} \times 2.000 \text{ kcal dia}^{-1} = 2{,}9 \times 10^7 \text{ kcal em 40 anos}$$

Para maior simplicidade, suponhamos que a alimentação dessa mulher consiste predominantemente em ácidos graxos derivados de lipídio. A densidade energética dos ácidos graxos é de 9 kcal g^{-1}. Por conseguinte, no decorrer de 40 anos, essa mulher ingeriu

$$2{,}9 \times 10^7 \text{ kcal}/9 \text{ kcal g}^{-1} = 3{,}2 \times 10^6 \text{ g} = 3.200 \text{ kg de alimento}$$

o que equivale a mais de 6 toneladas de alimento! Todavia, de modo notável, seu peso corporal permaneceu constante sem ela ter tido a necessidade de aferir e igualar acuradamente e de modo constante o aporte e o gasto de energia. Embora a força de vontade, o exercício físico e uma balança no banheiro frequentemente desempenhem um papel nessa homeostasia, deve ocorrer alguma sinalização bioquímica para ajudar a sua regulação energética. Na verdade, é isso que ocorre; todavia, antes de analisarmos esse tipo de regulação, sejamos um pouco cruéis com a nossa mulher hipotética e suponhamos que o seu peso aumentou 10% no decorrer desses 40 anos, um ganho percentual que a maioria das pessoas com 65 anos de idade aceitaria facilmente. Assim, aos 65 anos, ela está pesando 59,4 kg. Em uma base diária, que aumento no aporte de energia – consumo de alimentos – poderia resultar em um ganho de 5,4 kg no decorrer de 40 anos? Mais uma vez, consideremos apenas as gorduras.

$$5{,}4 \text{ kg} = 5{,}4 \times 10^3 \text{ g} = \text{ganho de peso total}$$
$$5{,}4 \times 10^3 \text{ g} (40 \text{ anos } 365 \text{ dias ano}^{-1})^{-1} = 0{,}37 \text{ g dia}^{-1}$$

Por conseguinte, para ganhar 5,4 kg em 40 anos, a mulher precisou comer apenas 0,37 g a mais por dia do que o necessário para suprir suas necessidades bioquímicas. Que quantidade de alimento isso representa? Considere a manteiga, que é essencialmente gordura pura; 0,38 g de manteiga correspondem aproximadamente a um quarto de uma rodela. Assim, o simples excesso de um equivalente a um quarto de rodela de manteiga por dia irá resultar em um ganho modesto de 5,4 kg no decorrer de 40 anos – um fato assustador, se não deprimente. Entretanto, até mesmo pequenos exemplos de amigos e família mostram que esse ganho de peso hipotético não se aplica a todos. As pessoas variam significativamente no modo pelo qual seus corpos são capazes de regular o aporte de energia; uma rodela adicional de manteiga por dia pode não fazer nenhuma diferença a longo prazo em uma pessoa, enquanto outra pessoa pode ter muito mais do que um ganho de 10% de peso no decorrer de 40 anos. Em circunstâncias semelhantes, a questão 33 ilustra como um pequeno excesso no consumo é necessário para o desenvolvimento de obesidade no decorrer de um período de 40 anos.

27.2 O cérebro desempenha um papel essencial na homeostasia calórica

O que torna possível esse notável equilíbrio entre aporte e gasto de energia? Como podemos imaginar, a resposta é complicada, englobando muitos sinais bioquímicos, bem como inúmeros fatores comportamentais. Concentremo-nos em alguns sinais bioquímicos essenciais, e dividamos a nossa análise em duas partes: sinais a curto prazo, que são ativos durante uma refeição, e sinais a longo prazo, relacionados com o estado energético global do corpo. Esses sinais originam-se no trato gastrintestinal, nas células β do pâncreas e nas células adiposas. O principal alvo desses sinais é o cérebro, em particular um grupo de neurônios em uma região do hipotálamo denominada núcleo arqueado.

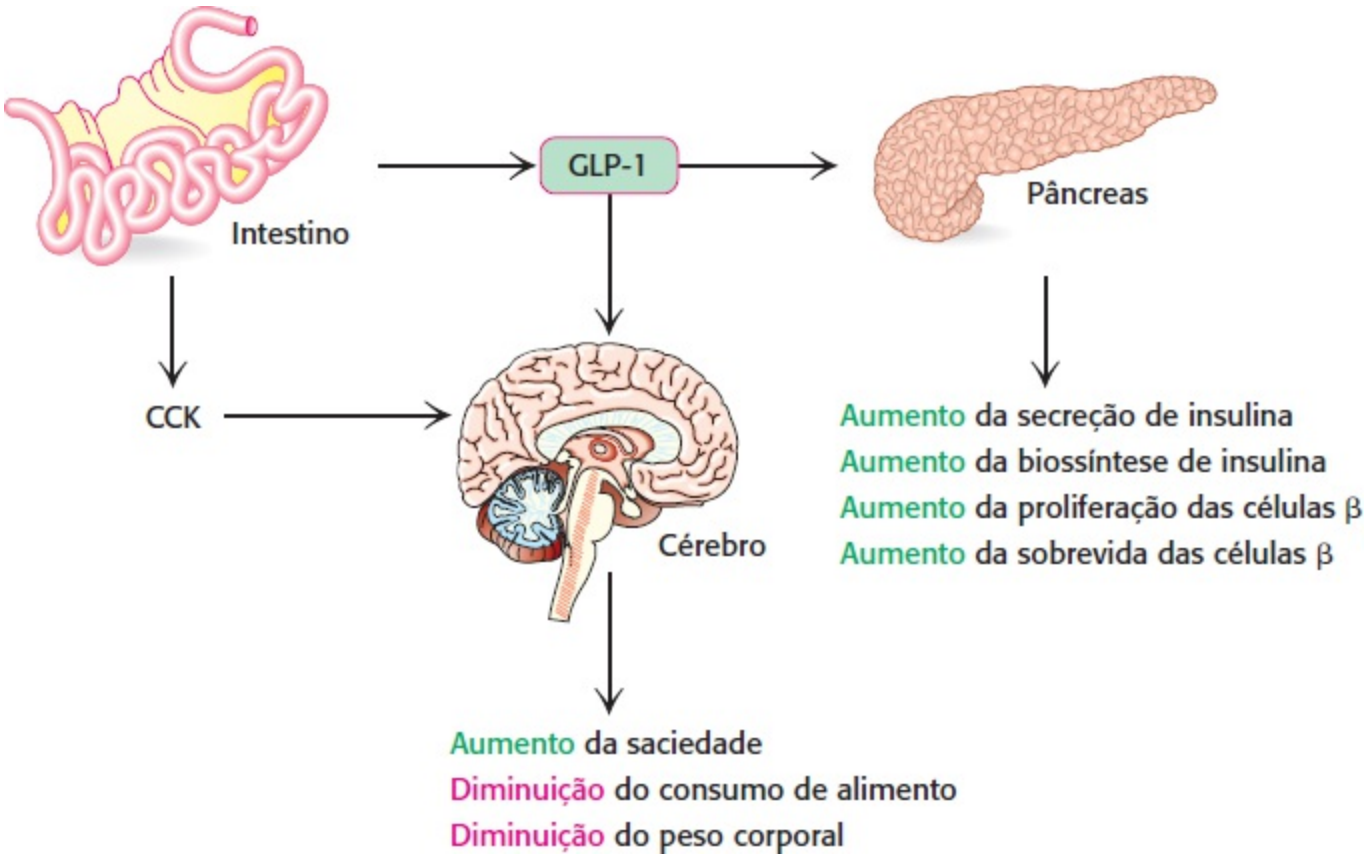


Figura 27.2 Sinais de saciedade. A colecistocinina (CCK) e o peptídio semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) são moléculas de sinalização que induzem uma sensação de saciedade no cérebro. A CCK é secretada por células especializadas do intestino delgado em resposta a uma refeição e ativa as vias de saciedade no cérebro. O GLP-1, que é secretado por células L no intestino, também ativa as vias de saciedade no cérebro e potencializa a ação da insulina no pâncreas. [De S. C. Wood. Cell Metab. 9:489-498, 2009, Figura 1.]

Sinais provenientes do trato gastrintestinal induzem a sensação de saciedade

Os sinais a curto prazo transmitem a sensação de saciedade do intestino para várias regiões do cérebro e, assim, reduzem o impulso de alimentar-se (Figura 27.2). O sinal a curto prazo mais bem estudado é a colecistocinina (CCK). A *colecistocinina* é, na verdade, uma família de hormônios peptídicos de vários comprimentos (de 8 a 58 aminoácidos de comprimento, dependendo do processamento pós-traducional), que são secretados no sangue por células nas regiões do duodeno e jejuno do intestino delgado, como sinal de saciedade pós-prandial. A CCK liga-se ao receptor de CCK, um receptor acoplado à proteína G (p. 410), localizado em vários neurônios periféricos que

transmite sinais ao cérebro. Essa ligação desencadeia uma via de transdução de sinais no cérebro, que gera uma sensação de saciedade. A CCK também desempenha um papel importante na digestão, estimulando a secreção de enzimas pancreáticas e de sais biliares da vesícula biliar.

Tabela 27.2 Peptídios gastrintestinais que regulam a ingestão de alimentos.

Sinais supressores do apetite
Colecistocinina
Peptídio semelhante ao glucagon 1
Peptídios semelhante ao glucagon 2
Amilina
Somatostatina
Bombesina
Enterostatina
Apolipoproteína A-IV
Peptídio inibitório gástrico
Peptídios estimuladores do apetite
Grelina

Fonte: De M. H. Stipanuk, Ed., *Biochemical, Physiological, Molecular Aspects of Human Nutrition*, 2d ed. (Saunders/Elsevier. 2006), p. 627, Box 22-1.

Outro sinal importante no intestino é o *peptídio semelhante ao glucagon 1* (GLP-1), um hormônio de aproximadamente 30 aminoácidos de comprimento. O GLP-1, que é secretado pelas células L do intestino, isto é, células secretoras de hormônio localizadas em todo o revestimento do trato gastrintestinal, exerce uma variedade de efeitos, todos aparentemente facilitados pela sua ligação a um receptor de GLP-1, outro receptor acoplado à proteína G. À semelhança da CCK, o GLP-1 induz uma sensação de saciedade, que inibe a ingestão subsequente de alimentos. O GLP-1 também potencializa a secreção de insulina pelas células β do pâncreas induzida pela glicose, enquanto inibe a secreção de glucagon. Embora tenhamos examinado apenas dois sinais a curto prazo, acredita-se que existam muitos outros (Tabela 27.2). Os sinais a curto prazo identificados até o momento consistem, em sua maioria, em supressores do apetite. A grelina, um peptídio de 28 aminoácidos de comprimento secretado pelo estômago, atua em regiões do hipotálamo, onde estimula o apetite por meio de seu receptor, um receptor acoplado à proteína G. A secreção de grelina aumenta antes de uma refeição e, em seguida, diminui.

A leptina e a insulina regulam o controle a longo prazo da homeostasia calórica

A homeostasia energética, dentro de uma escala de tempo de horas ou dias, é regulada por duas moléculas de sinalização-chave: a *leptina*, que é secretada pelos adipócitos, e a *insulina*, que é secretada pelas células β do pâncreas. A leptina está relacionada com o estado das reservas de triacilgliceróis, enquanto a insulina está relacionada com o estado da glicemia – em outras palavras, com a disponibilidade de carboidratos. Consideraremos inicialmente a leptina.

O tecido adiposo era anteriormente considerado um depósito inerte de triacilgliceróis. Entretanto, pesquisas recentes demonstraram que o tecido adiposo é um tecido endócrino ativo, que secreta moléculas de sinalização, denominadas *adipocinas*, como a leptina, que regulam inúmeros processos fisiológicos. A leptina é secretada pelos adipócitos em proporção direta à quantidade de gordura presente. Quanto mais gordura no corpo, maior a secreção de leptina. A ligação da leptina a seu receptor em todo o corpo aumenta a sensibilidade do músculo e do fígado à insulina, estimula a β-oxidação dos ácidos graxos e diminui a síntese de triacilgliceróis.

Consideremos os efeitos da leptina no cérebro. A leptina exerce seus efeitos por meio de sua ligação a receptores de membrana em varias regiões do cérebro, particularmente do núcleo arqueado do hipotálamo. Nesse núcleo, uma população de neurônios expressa peptídios estimuladores do apetite (orexigênicos), denominados neuropeptídio Y (NPY) e peptídio relacionado com aguti (AgRP). A leptina inibe os neurônios NPY/AgRP, impedindo a liberação de NPY e de AgRP e, portanto, reprimindo o desejo de se alimentar. Por outro lado, o jejum estimula a produção de NPY e de AgRP (Figura 27.3), devido a uma redução dos níveis de leptina que resulta da diminuição do tecido adiposo.

A segunda população de neurônios que contêm receptores de leptina expressa um grande polipeptídio precursor, a pró-opiomelanocortina (POMC). Em resposta à ligação da leptina a seu receptor nos neurônios de POMC, a POMC é processada proteoliticamente, produzindo uma variedade de moléculas sinalizadoras, uma das quais, o *hormônio melanócito estimulante* (MSH), é particularmente importante nesse contexto. O MSH, originalmente descoberto como estimulador dos melanócitos (células que sintetizam o pigmento melanina), ativa os neurônios supressores do apetite (anorexigênicos), inibindo, assim, o consumo de alimentos. O jejum inibe a atividade do MSH e, portanto, estimula a alimentação. O AgRP inibe a atividade do MSH ao atuar como antagonista, ligando-se ao receptor de MSH, porém sem ativálo (Figura 27.3). Por conseguinte, o efeito final da ligação da leptina a seu receptor consiste na iniciação de uma complexa via de transdução de sinais, que em última análise reduz a ingestão de alimento.

São também encontrados receptores de insulina no hipotálamo, embora o mecanismo de ação da insulina no cérebro não esteja tão bem esclarecido quanto o da leptina. A insulina parece inibir os neurônios produtores de NPY/AgRP, inibindo, assim, o consumo de alimentos.

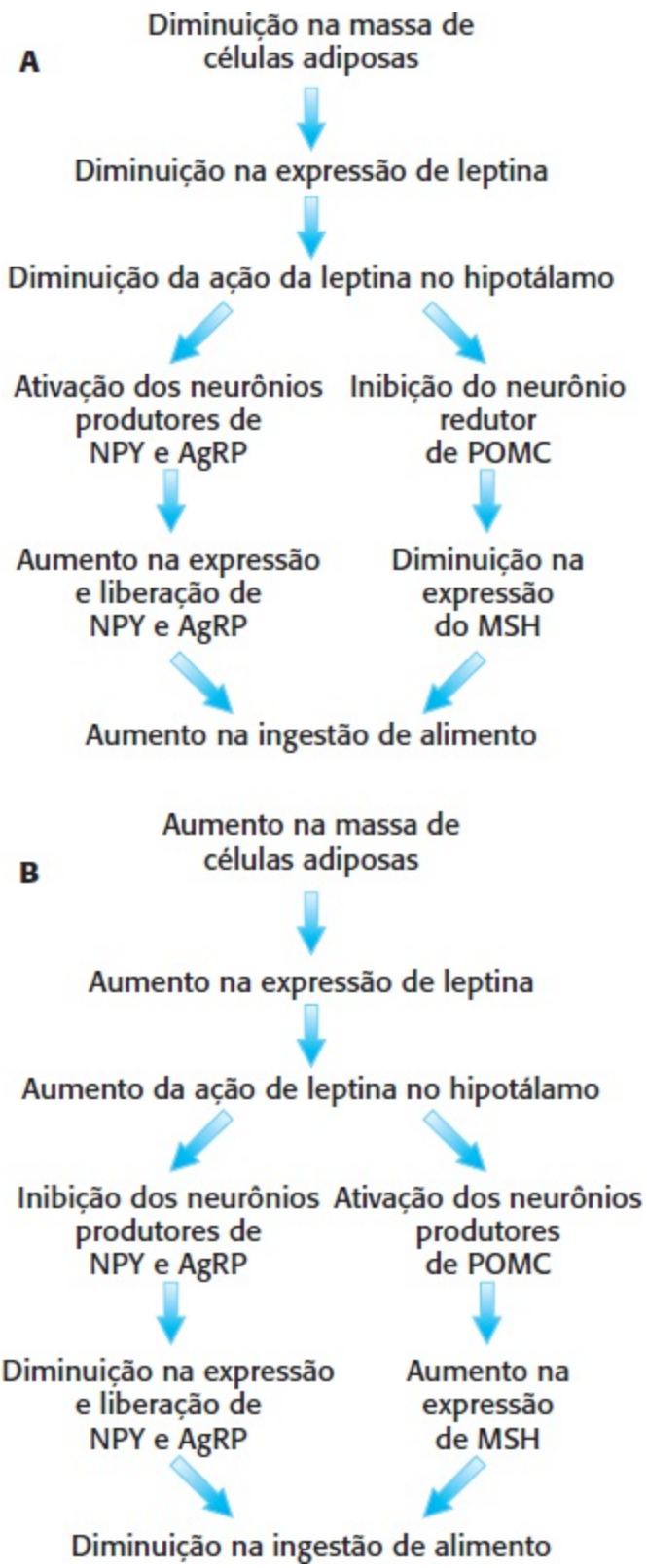


Figura 27.3 Os efeitos da leptina no cérebro. A leptina é uma adipocina secretada pelo tecido adiposo relacionada diretamente com a massa de gordura. **A**. Quando os níveis de leptina caem, como observado durante o jejum, são secretados os neuropeptídios estimuladores do apetite NPY e AgRP, enquanto a secreção dos sinais supressores do apetite, como o MSH, é inibida. **B**. Quando aumenta a massa de gordura, a leptina inibe a secreção de NPY e AgRP, enquanto estimula a liberação de MSH, um hormônio supressor do apetite. [De M. H. Stipanuk, *Biochemical, Physiological, & Molecular Aspects of Human Nutrition*, 2d Ed. (Saunders-Elsevier, 2006), Fig. 22.2.]

A leptina é um de vários hormônios secretados pelo tecido adiposo

A leptina foi a primeira adipocina descoberta em virtude dos efeitos dramáticos de sua ausência. Pesquisadores descobriram uma cepa de camundongos, denominados camundongos ob/ob, que

carecem de leptina e que, em consequência, são extremamente obesos. Esses camundongos apresentam hiperfagia (alimentam-se excessivamente), hiperlipidemia (acúmulo de triacilglicerídios no músculo e no fígado) e são insensíveis à insulina. Desde a descoberta da leptina, outras adipocinas foram detectadas. Por exemplo, a adiponectina é outra molécula de sinalização produzida pelos adipócitos que atua de modo semelhante à leptina. Tanto a leptina quanto a adiponectina exercem seus efeitos pela enzima reguladora-chave, a proteína quinase dependente de AMP (AMPK). Convém lembrar que essa enzima é ativa quando os níveis de AMP estão elevados e os níveis de ATP diminuídos, e essa ativação leva a uma redução do anabolismo e a um aumento do catabolismo, mais notavelmente um aumento na oxidação de ácidos graxos. Em animais obesos resistentes à insulina, como os camundongos ob/ob, os níveis de leptina aumentam, enquanto os de adiponectina diminuem.

Os adipócitos também produzem dois hormônios, o *RBP4* e a *resistina*, que promovem a resistência à insulina. Embora não se tenha esclarecido o motivo pelo qual os adipócitos secretam hormônios que facilitam a resistência à insulina, que é uma condição patológica, podemos especular a resposta. Essas moléculas de sinalização podem ajudar a sintonizar com precisão as ações da leptina e da adiponectina ou, talvez, atuar como "freios" sobre a ação da leptina e da adiponectina, impedindo o desenvolvimento de hipoglicemia no estado de jejum. Algumas evidências indicam que os adipócitos aumentados em decorrência da obesidade podem secretar níveis mais elevados de hormônios que antagonizam a insulina, contribuindo, assim, para a resistência à insulina.

A resistência à leptina pode ser um fator que contribui para a obesidade

Se a leptina é produzida proporcionalmente à massa de gordura corporal, e ela inibe a ingestão de alimentos, por que as pessoas se tornam obesas? Na maioria dos casos, os indivíduos obesos apresentam tanto leptina funcional quanto níveis elevados de leptina no sangue. A incapacidade de responder aos efeitos anorexigênicos da leptina é denominada *resistência à leptina*. Qual é a base da resistência à leptina?

Como a maioria das perguntas nesse campo interessante da homeostasia energética, a resposta ainda não está bem elaborada, porém há evidências recentes da possível participação de um grupo de proteínas, denominadas *supressores da sinalização de citocinas* (SOCS, do inglês *suppressors of cytokine signaling*). Essas proteínas controlam de maneira precisa alguns sistemas hormonais, inibindo a ação dos receptores. As proteínas SOCS inibem a sinalização dos receptores de diversas modos (Figura 27.4). Consideremos, por exemplo, o efeito dos SOCS sobre o receptor de insulina. Convém lembrar que a insulina estimula a autofosforilação dos resíduos de tirosina no receptor de insulina, desencadeando a via de sinalização de insulina (Figura 27.5). As proteínas SOCS ligam-se aos resíduos de tirosina fosforilada nos receptores ou em outros membros da via de transdução de sinal, interrompendo, assim, o fluxo de sinais e alterando consequentemente a atividade bioquímica da célula. Em outros casos, a ligação das proteínas SOCS a componentes da via de transdução de sinal também pode intensificar a degradação proteolítica desses componentes pelo proteassoma. As evidências que apontam para um papel das proteínas SOCS na resistência à leptina provêm de camundongos com deleção seletiva de SOCS dos neurônios que expressam a POMC. Esses camundongos exibem maior sensibilidade à leptina e são resistentes a um ganho de peso, mesmo quando alimentados com uma dieta rica em gordura. A razão pela qual a atividade das proteínas SOCS aumenta, levando à resistência à leptina, ainda não foi estabelecida.

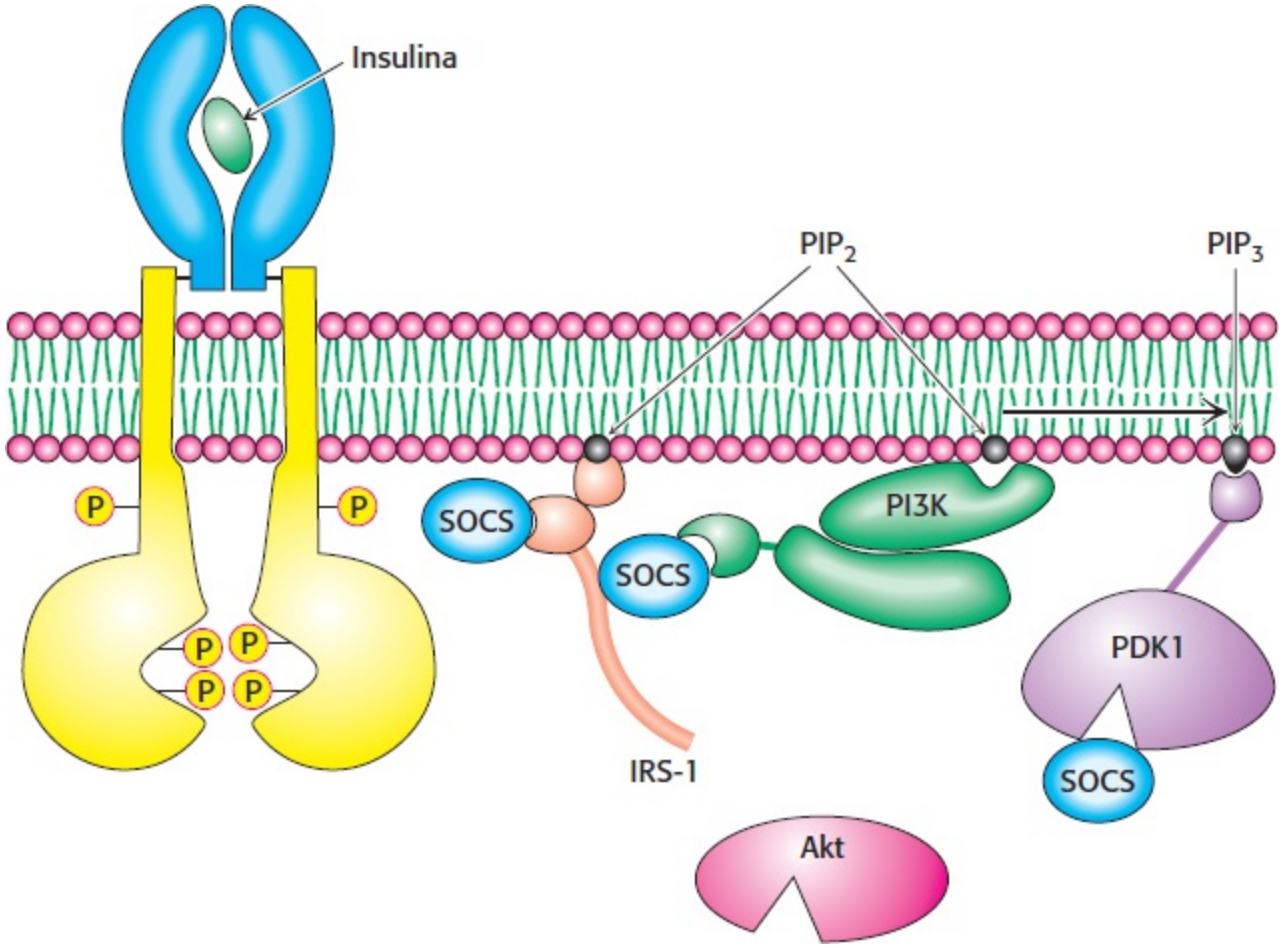


Figura 27.4 Os supressores da sinalização de citocinas (SOCS) regulam a função dos receptores. Os SOCS rompem as interações de componentes da via de sinalização da insulina e, portanto, inibem essa via. A ligação de um componente de sinal a SOCS resulta em degradação proteassômica em alguns casos. Akt, uma proteína quinase; IRS-1, substrato do receptor de insulina 1; PDK1, proteína quinase dependente de PIP_3; PIP_3, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato; SOCS, supressor da sinalização de citocinas.

Utiliza-se a dieta para combater a obesidade

Tendo em vista a epidemia de obesidade que atualmente nos aflige, e os distúrbios associados, muita atenção tem sido dispensada para determinar a dieta mais efetiva para perda de peso. Em geral, duas categorias de dietas ajudam a controlar o aporte calórico – as dietas pobres em carboidratos e as dietas pobres em gordura. As dietas com baixo teor de carboidrato enfatizam habitualmente o consumo de proteínas. Embora os estudos dos efeitos das dietas sobre os seres humanos sejam imensamente complexos, há cada vez mais dados que sugerem que as dietas pobres em carboidratos e ricas em proteínas podem ser as mais efetivas para a perda de peso. As razões para isso ainda não foram esclarecidas, porém existem duas hipóteses comuns. Na primeira hipótese, as proteínas parecem induzir uma sensação de saciedade mais efetivamente do que as gorduras ou os carboidratos. Na segunda hipótese, as proteínas necessitam de mais energia do que as gorduras ou os carboidratos para a sua digestão, e o maior gasto de energia contribui para a perda de peso. Por exemplo, estudos recentes mostraram que uma dieta composta de 30% de proteína necessita quase 30% mais energia para a sua digestão do que uma dieta composta de 10% de proteína. Os mecanismos pelos quais as dietas ricas em proteínas aumentam o gasto energético e a sensação de saciedade ainda não foram estabelecidos. Qualquer que seja o tipo de dieta, a máxima “coma menos, faça mais exercícios” sempre é válida.

27.3 O diabetes é uma doença metabólica comum, que frequentemente resulta da obesidade

Com esta visão geral da regulação do peso corporal, examinemos agora os resultados bioquímicos quando a regulação falha em virtude do comportamento, da genética ou de uma combinação de ambos. O resultado mais comum dessa falha é a obesidade, uma condição em que o excesso de energia é armazenado na forma de triacilglicerídios. Convém lembrar que todo consumo de alimento em excesso acaba sendo convertido em triacilglicerídios. Os seres humanos mantêm o equivalente a cerca de 1 dia de glicogênio, e, após a reposição dessas reservas, o excesso de carboidratos é convertido em gorduras e, a seguir, em triacilgliceróis. Os aminoácidos não são armazenados, de modo que os aminoácidos em excesso também acabam sendo convertidos em gordura. Por conseguinte, independentemente do tipo de alimento consumido, o consumo em excesso resulta em aumento das reservas de gordura.

Diabetes

Nome dado em virtude da micção excessiva na doença. Areteu, um médico da Capadócia do século II d.C., escreveu: "O epíteto diabetes foi atribuído ao distúrbio, algo como a passagem de água por um sifão." Ele caracterizou com perspicácia o diabetes como "uma desintegração da carne e dos membros em urina".

Melito

Do latim "adoçado com mel", refere-se à presença de açúcar na urina de pacientes com a doença. O termo *melito* distingue essa doença do diabetes *insípido*, que é causado pelo comprometimento da reabsorção renal de água.

Começamos a considerar os efeitos de perturbações da homeostasia calórica com o *diabetes melito*, uma doença complexa caracterizada pelo uso anormal de substratos energéticos: *a glicose é produzida em excesso pelo fígado e subutilizada pelos outros órgãos*. A incidência do diabetes melito (habitualmente designado simplesmente como *diabetes*) é de cerca de 5% da população. De fato, o diabetes é a doença metabólica grave mais comum no mundo; afeta centenas de milhões de indivíduos. O *diabetes tipo 1* é causado pela destruição autoimune das células β do pâncreas secretoras de insulina e, em geral, começa antes dos 20 anos. O diabetes tipo 1 também é denominado diabetes insulinodependente, o que significa que o indivíduo acometido necessita da administração da insulina para sobreviver. Por outro lado, os diabéticos apresentam, em sua maioria, níveis normais ou até mesmo mais elevados de insulina no sangue, porém não respondem ao hormônio, uma característica denominada *resistência à insulina*. Essa forma da doença, conhecida como *diabetes tipo 2*, surge tipicamente mais tarde na vida do que a forma insulinodependente. O diabetes tipo 2 é o responsável por aproximadamente 90% dos casos de diabetes no mundo inteiro e constitui a doença metabólica mais comum no mundo. Nos EUA, trata-se da principal causa de cegueira, insuficiência renal e amputação. *A obesidade constitui um fator predisponente significativo para o desenvolvimento de diabetes tipo 2.*

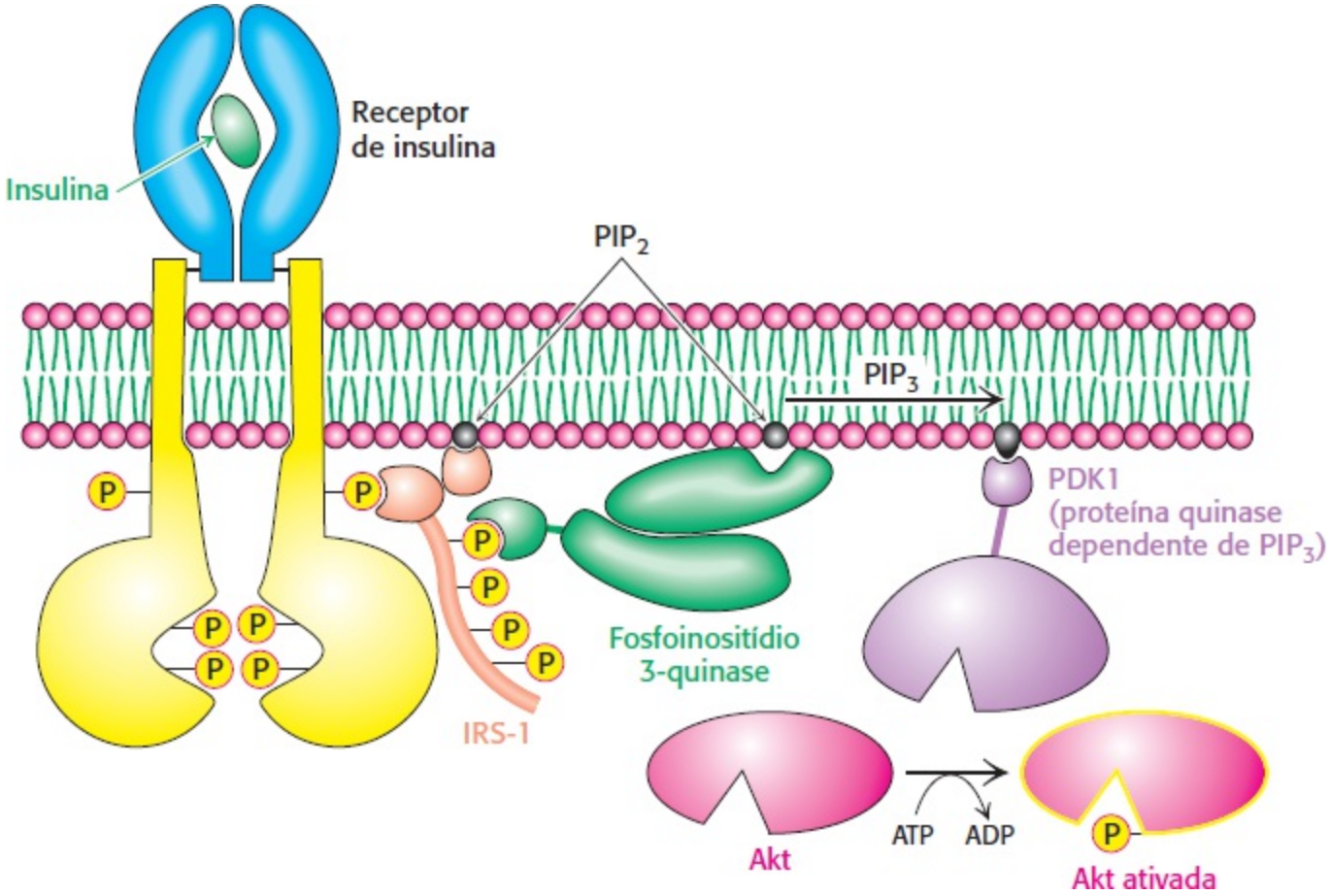


Figura 27.5 Sinalização da insulina. A ligação da insulina resulta em fosforilação cruzada e ativação do receptor de insulina. Os sítios fosforilados do receptor atuam como sítio de ligação para substratos do receptor de insulina, como IRS-1. A quinase de lipídios, a fosfoinositídio 3-quinase, liga-se aos sítios fosforilados no IRS-1 por meio de seu domínio regulador e, em seguida, converte o PIP_2 em PIP_3. A ligação ao PIP_3 ativa a proteína quinase dependente de PIP_3, que fosforila e ativa quinases como a Akt1. A seguir, a Akt1 ativada pode difundir-se pela célula e continuar a via de transdução de sinais.

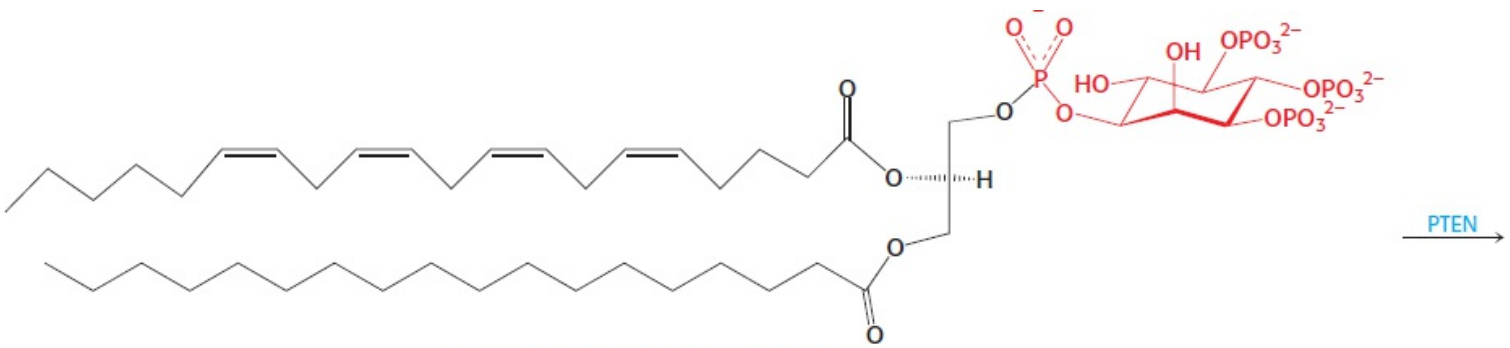
A insulina dá início a uma complexa via de transdução de sinal no músculo

Qual é a base bioquímica da resistência à insulina? Como a resistência à insulina leva à falência das células β do pâncreas, resultando em diabetes tipo 2? Como a obesidade contribui para essa progressão? Para respondermos a essas perguntas e começarmos a desvendar os mistérios dos distúrbios metabólicos, examinemos em primeiro lugar o mecanismo de ação da insulina no músculo, o maior tecido regulado pela insulina.

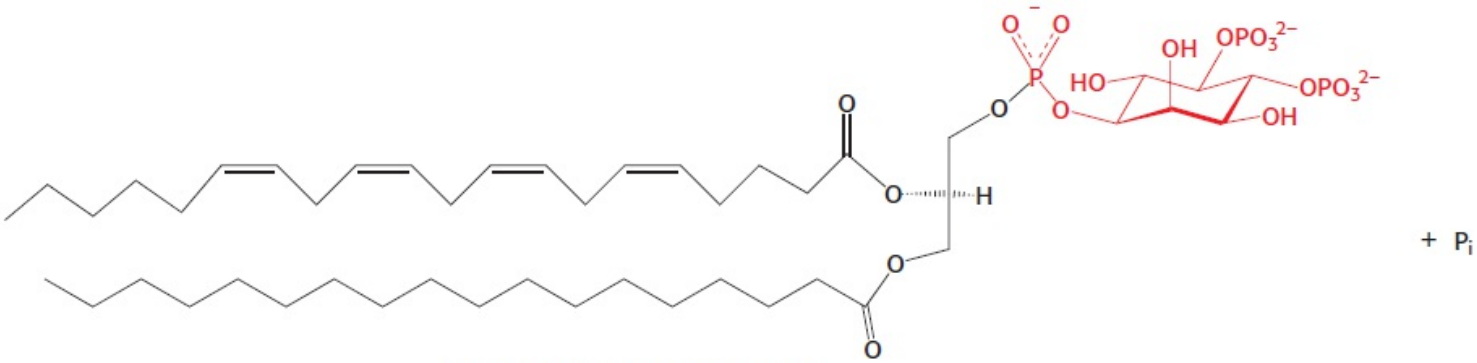
Em uma célula normal, a insulina liga-se a um receptor, que sofre dimerização e autofosforilação nos resíduos de tirosina, e que cada subunidade do dímero fosforila o seu parceiro. A fosforilação do receptor gera sítios de ligação para substratos do receptor de insulina (IRS), como o IRS-1 (Figura 27.5). A fosforilação subsequente de IRS-1 pela atividade de tirosina quinase do receptor de insulina inicia a via de sinalização da insulina. O IRS-1 fosforilado liga-se à fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), ativando-a. A PI3K catalisa a conversão do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3), um segundo mensageiro. O PIP_3 ativa a proteína quinase dependente de fosfatidilinositol (PDK), que, por sua vez, ativa várias outras quinases, mais notavelmente a proteína quinase B (PKB), também conhecida como Akt. A proteína quinase Akt facilita a translocação de vesículas contendo GLUT-4 para a membrana celular, o que intensifica mais a absorção de glicose do sangue. Além disso, a Akt fosforila e inibe a glicogênio sintase

quinase (GSK3). Convém lembrar que a GSK3 inibe a glicogênio sintase (p. 633). Por conseguinte, a insulina também leva à ativação da glicogênio sintase e aumenta a síntese de glicogênio.

Como todas as vias de sinalização, é preciso que a cascata de sinalização da insulina seja capaz de ser interrompida. Três processos diferentes contribuem para a infrarregulação da sinalização da insulina. Em primeiro lugar, as fosfatases desativam o receptor de insulina e destroem um segundo mensageiro essencial. A *tirosina fosfatase IB* remove grupos fosforila do receptor, resultando em sua inativação. O segundo mensageiro PIP_3 é inativado pela fosfatase *PTEN* (fosfatase e homólogo da tensina), que o desfosforila, formando PIP_2, que carece de propriedades de segundo mensageiro.



Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3)



Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2)

Em segundo lugar, a proteína IRS pode ser inativada pela fosforilação dos resíduos de serina por Ser/Tre quinases específicas. Essas quinases são ativadas pela nutrição excessiva e outros sinais de estresse e podem desempenhar um papel no desenvolvimento da resistência à insulina. Por fim, as proteínas SOCS, proteínas reguladoras discutidas anteriormente, interagem com o receptor de insulina e IRS-1 e, aparentemente, facilitam a sua degradação proteolítica pelo complexo de proteassoma.

A síndrome metabólica frequentemente precede o diabetes tipo 2

A partir dos conhecimentos dos componentes-chave da homeostasia energética, começaremos a nossa investigação da base bioquímica da resistência à insulina e do diabetes tipo 2. A obesidade é o fator que contribui para o desenvolvimento de resistência à insulina, que constitui um evento precoce na via que leva ao diabetes tipo 2. Com efeito, um conjunto de patologias – incluindo resistência à insulina, hiperglicemia, dislipidemia (níveis sanguíneos elevados de triacilgliceróis, colesterol e lipoproteínas de baixa densidade) – com frequência surgem simultaneamente. Acredita-se que esse conjunto, denominado *síndrome metabólica*, preceda o diabetes tipo 2.

Uma consequência da obesidade é que a quantidade de triacilglicerídios consumidos excede a

capacidade de armazenamento do tecido adiposo. Em consequência outros tecidos começam a acumular gordura, mais notavelmente o fígado e o músculo (Figura 27.6). Por motivos que serão explicados posteriormente neste capítulo, esse acúmulo resulta em resistência à insulina e, por fim, em insuficiência pancreática. Estudemos agora o músculo e as células β do pâncreas.

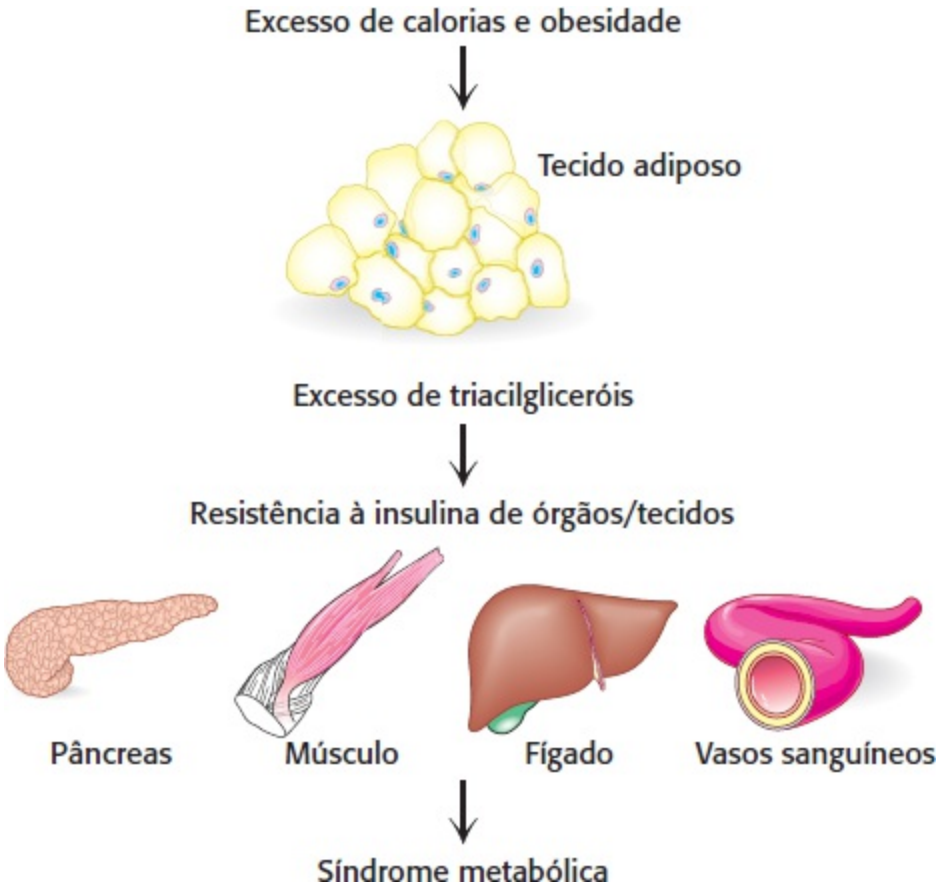


Figura 27.6 A capacidade de armazenamento do tecido adiposo pode ser ultrapassada na obesidade. Na presença de excesso calórico, a capacidade de armazenamento dos adipócitos pode ser ultrapassada, com resultados deletérios. A gordura acumula-se em outros tecidos, que consequentemente sofrem disfunção bioquímica. Quando o pâncreas, o músculo o fígado e as células de revestimento dos vasos sanguíneos são afetados, pode ocorrer uma síndrome metabólica, uma condição que frequentemente precede o diabetes tipo 2. [De S. Fröjdö, H. Vidal, and L. Pirola. Biochim. Biophys. Acta 1792:83-92, 2009, Fig. 1.]

Os ácidos graxos em excesso no músculo modificam o metabolismo

Em várias circunstâncias, ressaltamos a importância das gorduras como fonte de energia para as células. Na obesidade, as gorduras estão presentes em quantidades maiores do que as que podem ser processadas pelo músculo. Embora a taxa de β-oxidação aumente em resposta a uma alta concentração de gordura, as mitocôndrias não são capazes de processar todos os ácidos graxos por β-oxidação; em consequência, os ácidos graxos acumulam-se nas mitocôndrias e eventualmente passam para o citoplasma. Com efeito, a incapacidade de processar todos os ácidos graxos resulta em sua nova incorporação em triacilgliceróis e acúmulo de gordura no citoplasma. Os níveis de diacilglicerol e ceramida (um componente dos esfingolipídios) também aumentam no citoplasma. O diacilglicerol é um segundo mensageiro que ativa a proteína quinase C (PKC) (p. 411). Quando ativas, a PKC e outras Ser/Tre proteína quinases são capazes de fosforilar o IRS e reduzir a sua capacidade de propagar o sinal da insulina. A ceramida ou seus metabólitos inibem a captação de glicose e a síntese de glicogênio aparentemente ao inibir a PDK e a PKB (p. 805). O resultado é a

resistência à insulina induzida por alimentação (Figura 27.7).

A resistência à insulina no músculo facilita o desenvolvimento de insuficiência pancreática

Qual é o efeito da hiperalimentação sobre o pâncreas? Essa pergunta é importante, visto que a principal função do pâncreas consiste em responder à presença de glicose no sangue pela secreção de insulina, um processo designado como secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS, do inglês *glucose-stimulated insulin secretion*). Com efeito, a célula β é uma fábrica virtual de insulina. O mRNA da proinsulina constitui 20% do mRNA total do pâncreas, enquanto 50% da síntese de proteína total no pâncreas consiste em proinsulina, um precursor da insulina.

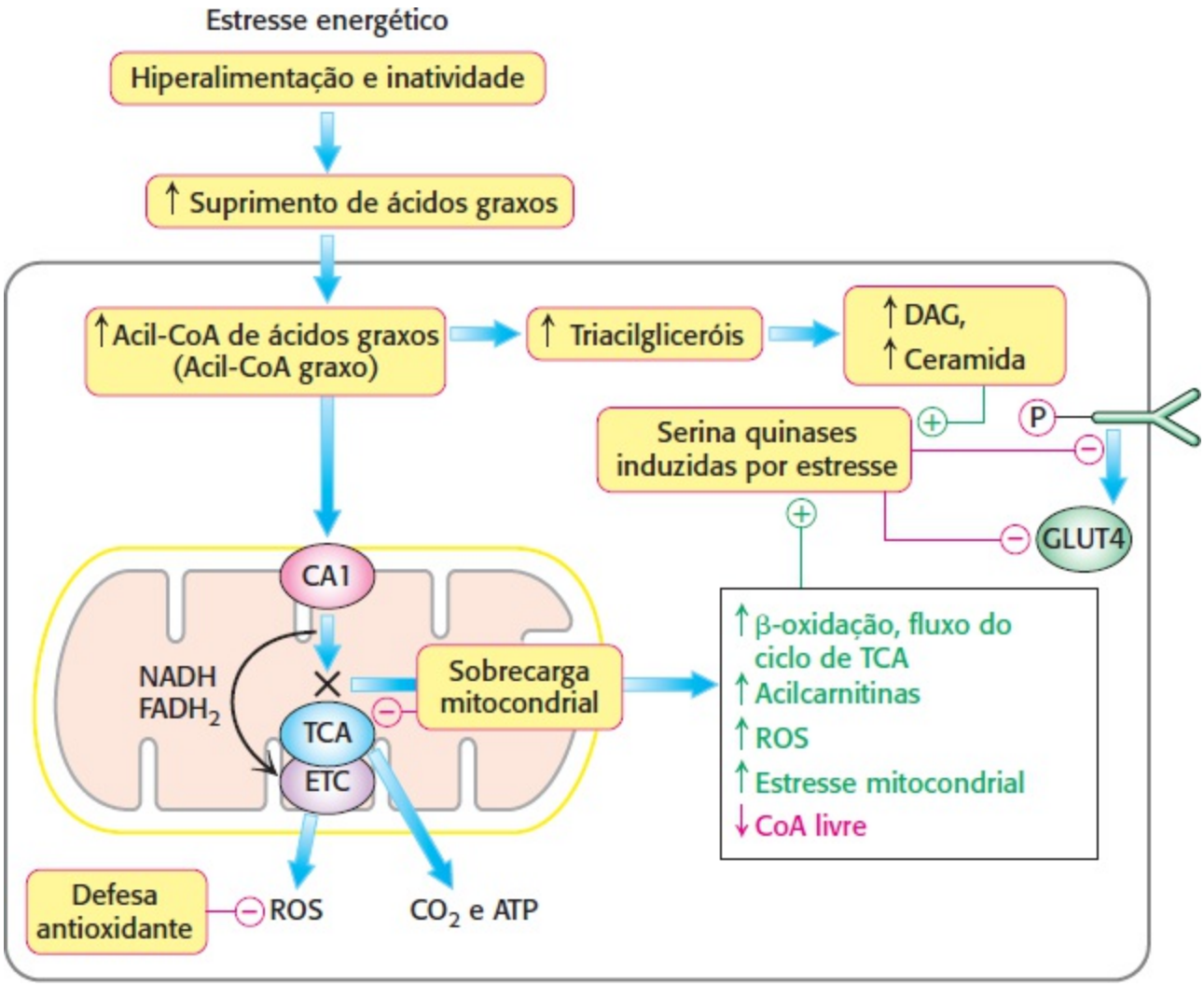


Figura 27.7 O excesso de gordura nos tecidos periféricos pode resultar em insensibilidade à insulina. O acúmulo de gordura nos tecidos periféricos, mais notavelmente no músculo, pode perturbar algumas vias de transdução de sinais e ativar inapropriadamente outras. Em particular, os diacilglicerídios e a ceramida ativam vias induzidas por estresse, que interferem na sinalização da insulina, resultando em resistência à insulina. DAG, diacilglicerol; TG, triacilglicerídios; ROS, espécies reativas de oxigênio; CA1, carnitina aciltransferase 1; GLUT4, transportador de glicose; ETC, cadeia de transporte de elétrons.

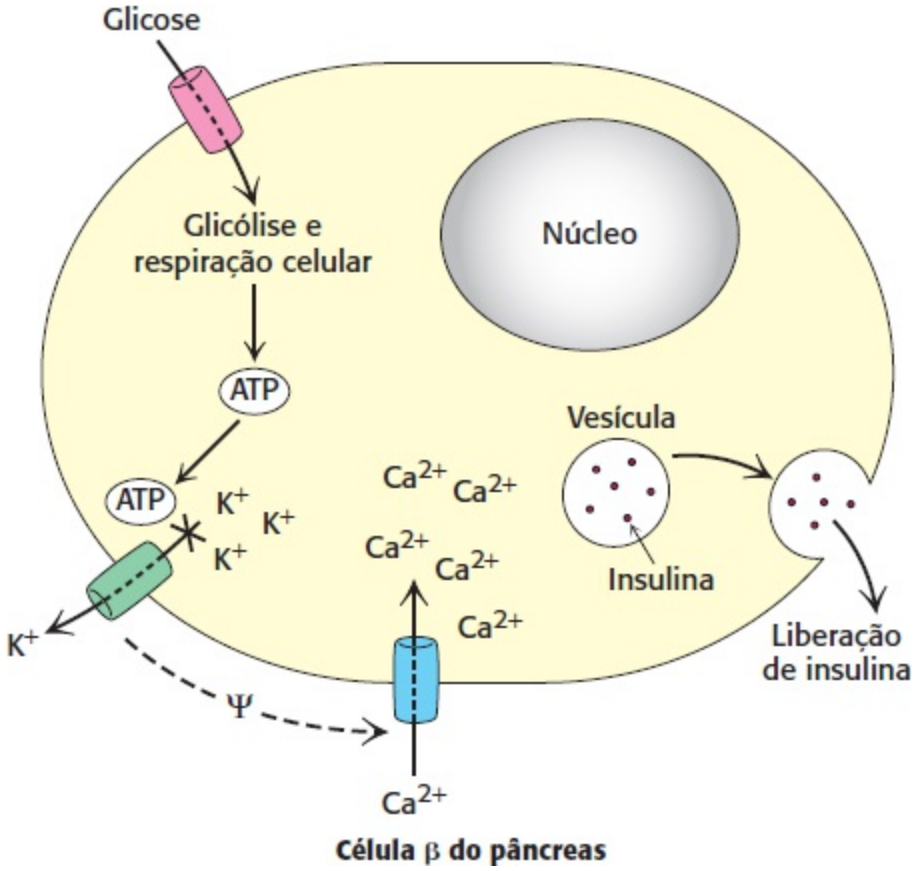


Figura 27.8 A liberação de insulina é regulada pelo ATP. O metabolismo da glicose pela glicólise e respiração celular aumenta a concentração de ATP, causando o fechamento de um canal de potássio sensível ao ATP. O fechamento desse canal altera a carga através da membrana (Ψ) e provoca a abertura de um canal de cálcio. O influxo de cálcio causa a fusão dos grânulos contendo insulina com a membrana plasmática, resultando na liberação de insulina no sangue.

A glicose penetra as células β do pâncreas por meio do transportador de glicose GLUT2. Convém lembrar que o GLUT2 só irá possibilitar o transporte de glicose quando a glicose estiver presente no sangue em grandes quantidades, assegurando a secreção de insulina somente quando a glicose estiver abundante, como depois de uma refeição. A célula β metaboliza a glicose a CO_2 e H_2O, no processo da respiração celular, produzindo ATP (Capítulos 16, 17 e 18). O consequente aumento da razão ATP/ADP determina o fechamento de um canal de K^+ sensível ao ATP, que, quando aberto, possibilita o fluxo de potássio para fora da célula (Figura 27.8). A alteração resultante no ambiente iônico da célula abre um canal de Ca^{2+}. O influxo de Ca^{2+} provoca a fusão das vesículas secretoras contendo insulina com a membrana celular, resultando em liberação de insulina no sangue. Por conseguinte, um aumento da carga energética em consequência do metabolismo da glicose é traduzido pelas proteínas de membrana em uma resposta fisiológica – a secreção de insulina e a remoção subsequente da glicose do sangue.

Que aspecto da função das células β acaba falhando em consequência da hiperalimentação, causando a transição da resistência à insulina para o diabetes tipo 2 totalmente desenvolvida? Convém lembrar que, em circunstâncias normais, as células β do pâncreas sintetizam grandes quantidades de proinsulina. A proinsulina enovela-se no retículo endoplasmático, é processada a insulina e, subsequentemente, é acondicionada em vesículas para secreção. Com o desenvolvimento da resistência à insulina no músculo, as células β respondem, passando a sintetizar mais insulina em uma tentativa útil de impulsionar a sua ação. A capacidade do retículo endoplasmático de processar toda a proinsulina e a insulina torna-se comprometida, resultando no chamado estresse do *retículo*

endoplasmático (RE), com acúmulo de proteínas não enoveladas ou enoveladas incorretamente. O estresse do RE dá início a uma via de sinalização denominada *resposta às proteínas não enoveladas* (UPR, do inglês *unfolded protein response*), uma via destinada a salvar a célula. A UPR consiste em várias etapas. Na primeira, a síntese de proteína geral é inibida, de modo a prevenir a entrada de mais proteínas no RE. Na segunda etapa, a síntese de chaperonas é estimulada. Convém lembrar que as chaperonas são proteínas que auxiliam o processo de enovelamento de outras proteínas. Na terceira etapa, as proteínas mal enoveladas são removidas do RE e, subsequentemente, são transportadas até o proteassoma para destruição. Por fim, se a resposta descrita não conseguir aliviar o estresse do RE, o processo de apoptose é deflagrado, levando consequentemente à morte da célula e ao diabetes tipo 2 totalmente desenvolvido.

Qual é o tratamento para o diabetes tipo 2? O tratamento é, em sua maior parte, de natureza comportamental. Os diabéticos são aconselhados a controlar a quantidade de calorias digeridas, assegurando, assim, que o aporte de energia não ultrapasse o gasto energético; a consumir uma alimentação rica em vegetais, frutas e cereais; e a praticar muito exercício aeróbico. Observe que essas diretrizes são as mesmas praticadas para se ter uma vida saudável, mesmo por pessoas que não sofrem de diabetes tipo 2. O tratamento específico para o diabetes tipo 2 inclui o monitoramento dos níveis de glicemia, de modo que permaneçam dentro da faixa-alvo (valor de referência de 3,6 a 6,1 mM). Para os indivíduos que não são capazes de manter níveis apropriados de glicose com os comportamentos descritos anteriormente, o tratamento farmacológico é necessário. A administração de insulina pode ser necessária na insuficiência pancreática, e o tratamento com metformina, que ativa a AMPK, pode ser efetivo.

As perturbações metabólicas observadas no diabetes tipo 1 resultam de deficiência da insulina e excesso de glucagon

Consideremos agora o diabetes tipo 1 de compreensão mais fácil. No diabetes tipo 1, a produção de insulina é insuficiente, em virtude da destruição autoimune das células β do pâncreas. Por conseguinte, a razão glucagon/insulina alcança níveis acima do normal. Em essência, o indivíduo diabético encontra-se em um modo bioquímico de jejum, apesar da presença de níveis elevados de glicemia. Por causa da deficiência de insulina, a *entrada de glicose nas células adiposas e musculares fica comprometida*. O fígado fica entalado em um estado de gliconeogênese e cetogênese. O estado gliconeogênico caracteriza-se pela produção excessiva de glicose. O nível excessivo de glucagon em relação ao da insulina leva à diminuição na quantidade de frutose 2,6-bifosfato (F-2,6-BP), que estimula a glicólise e inibe a gliconeogênese no fígado. Por conseguinte, a glicólise é inibida e a gliconeogênese é estimulada, devido aos efeitos opostos da F-2,6-BP sobre a fosfofrutoquinase e a frutose-1,6-bifosfatase (Seção 16.4; Figura 27.9). Essencialmente, a resposta das células à ausência de insulina amplifica a quantidade de glicose no sangue. A elevada razão glucagon/insulina no diabetes também promove a degradação do glicogênio. Consequentemente, *uma quantidade excessiva de glicose é produzida pelo fígado e liberada para o sangue*. Quando a concentração de glicose no sangue ultrapassa a capacidade reabsortiva dos túbulos renais, ela é excretada na urina (por isso o termo melito). A glicose excretada é acompanhada por água, de modo que o indivíduo diabético sem tratamento na fase aguda da doença tem fome e sede.

Devido ao comprometimento da utilização de carboidratos, a ausência de insulina leva à degradação descontrolada de lipídios e proteínas, resultando no estado cetogênico. Em seguida, são

produzidas grandes quantidades de acetil-CoA por β-oxidação. Entretanto, grande parte da acetil-CoA não pode entrar no ciclo do ácido cítrico, visto que não há oxaloacetato suficiente para a etapa de condensação. Convém lembrar que os mamíferos podem sintetizar o oxaloacetato a partir do piruvato, um produto da glicólise, mas não a partir da acetil-CoA; em seu lugar, produzem corpos cetônicos. *Uma notável característica do diabetes consiste no desvio do uso de substratos energético dos carboidratos para as gorduras; a glicose, mais abundante do que nunca, é desprezada*. Os corpos cetônicos, presentes em altas concentrações, sobrepujam a capacidade do rim de manter o equilíbrio ácido-base. O diabético sem tratamento pode entrar em coma, em consequência de redução do pH sanguíneo e da desidratação. É interessante ressaltar que a cetose diabética raramente constitui um problema no diabetes tipo 2, visto que o diabetes é ativo o suficiente para impedir a lipólise em excesso no fígado e no tecido adiposo.

Qual é o tratamento para o diabetes tipo 1? Muitos dos comportamentos descritos para o diabetes tipo 2 aplicam-se ao tipo 1: controlar a quantidade de calorias digeridas, praticar exercício físico e ter uma alimentação saudável. De modo semelhante, os níveis de glicemia precisam ser monitorados. O tratamento com insulina é necessário para a sobrevivência do paciente.

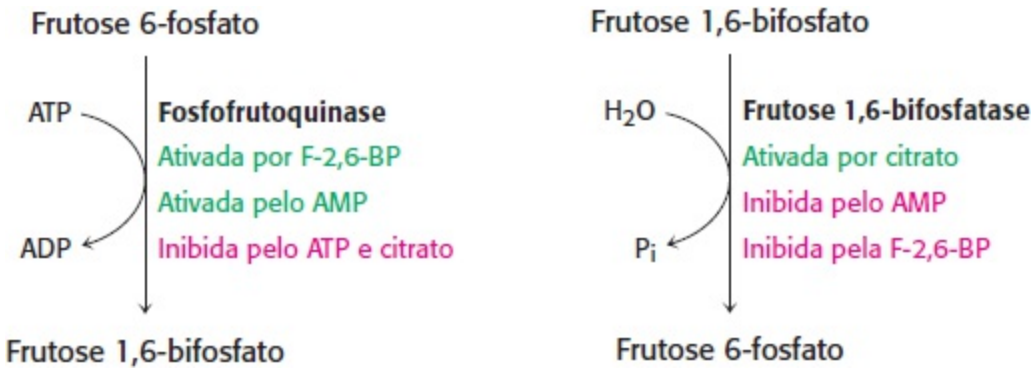


Figura 27.9 Regulação da glicólise e da gliconeogênese. A fosfofrutoquinase é a enzima-chave na regulação da glicólise, enquanto a frutose 1,6-bifosfatase é a enzima principal que controla a taxa de gliconeogênese. Observe a relação recíproca entre as vias e as moléculas de sinalização.

27.4 O exercício físico altera beneficamente a bioquímica das células

O exercício, somado a uma alimentação saudável, constitui um dos tratamentos mais efetivos para o diabetes, bem como para inúmeras outras condições patológicas, incluindo doença coronariana, hipertensão, depressão e uma variedade de tipos de câncer. No que concerne ao diabetes, o exercício aumenta a sensibilidade à insulina nos indivíduos que apresentam resistência à insulina ou diabetes tipo 2. Qual é a base desse efeito benéfico?

A biogênese mitocondrial é estimulada pela atividade muscular

Quando o músculo é estimulado a se contrair durante o exercício ao receber impulsos nervosos de neurônios motores, o cálcio é liberado do retículo sarcoplasmático. O cálcio induz a contração muscular, conforme será discutido no Capítulo 35, e convém lembrar que ele também é um segundo mensageiro poderoso, que frequentemente atua em associação com a calmodulina, uma proteína que liga cálcio (p. 412). Em sua atuação como segundo mensageiro, o cálcio estimula várias enzimas dependentes de cálcio, como a proteína quinase dependente de calmodulina. As enzimas dependentes

de cálcio, bem como a AMPK, em seguida ativam determinados complexos de fatores de transcrição. Como veremos nos Capítulos 29 e 31, os fatores de transcrição são proteínas que controlam a expressão dos genes. Dois padrões de expressão de genes, em particular, modificam-se em resposta ao exercício regular (Figura 27.10). O exercício regular aumenta a produção de proteínas necessárias para o metabolismo de ácidos graxos, como as enzimas da β-oxidação. É interessante assinalar que os próprios ácidos graxos funcionam como moléculas de sinalização, ativando a transcrição de enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos. Além disso, outro conjunto de fatores de transcrição ativado pela cascata de sinalização do cálcio institui uma reprogramação metabólica, que provoca um aumento da biogênese mitocondrial. Em seu conjunto, *o aumento na capacidade de oxidação dos ácidos graxos e as mitocôndrias adicionais possibilitam o metabolismo eficiente dos ácidos graxos*. Como os ácidos graxos em excesso resultam em resistência à insulina, conforme anteriormente discutido, o metabolismo eficiente dos ácidos graxos resulta em *aumento da sensibilidade à insulina*. Com efeito, os músculos de atletas bem treinados podem conter altas concentrações de triacilglicerídios e ainda manter notável sensibilidade à insulina.

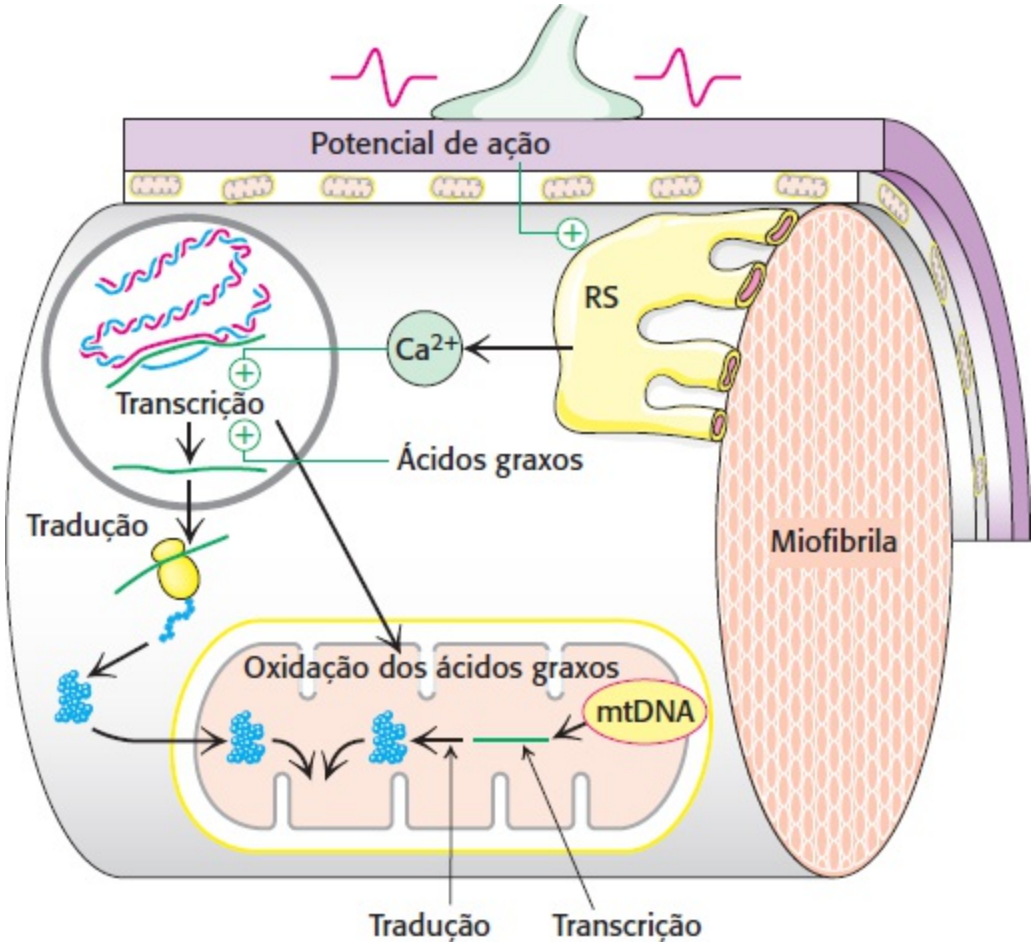


Figura 27.10 O exercício resulta em biogênese mitocondrial e aumento do metabolismo das gorduras. Um potencial de ação provoca a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS), o equivalente muscular do retículo endoplasmático. O Ca^{2+}, além de estimular a contração muscular, ativa fatores de transcrição nucleares que ativam genes, os quais, juntamente com genes mitocondriais, são responsáveis pela biogênese mitocondrial. Os ácidos graxos ativam um conjunto diferente de genes que aumentam a capacidade de oxidação dos ácidos graxos das mitocôndrias. [De D. A. Hood. *J. Appl. Physiol*. 90:1137-1157, 2001, Fig. 2.]

A escolha da fonte de energia durante o exercício é determinada pela intensidade e duração da atividade

Prosseguindo com nosso tópico sobre o uso da energia em diferentes condições fisiológicas, examinemos agora como as fontes de energia são utilizadas em diferentes tipos de exercício. As fontes de energia utilizadas em exercícios anaeróbicos, como a corrida de velocidade, diferem daquelas usadas em exercícios aeróbicos, como a corrida de fundo ou de longa distância. A escolha dos substratos energéticos durante essas diferentes formas de exercício ilustra muitas facetas importantes da transformação de energia e integração metabólica. O ATP aciona diretamente a miosina, a proteína imediatamente responsável pela conversão de energia química em movimento (Capítulo 35). Todavia, a quantidade de ATP no músculo é pequena. Por conseguinte, a produção de potência e, por sua vez, a velocidade de corrida dependem da taxa de produção de ATP a partir de outras fontes de energia. Como mostra a Tabela 27.3, a *creatina fosfato* (fosfocreatina) pode transferir rapidamente o seu grupo fosforila de alto potencial para o ADP, produzindo ATP. Entretanto, a quantidade de creatina fosfato, como a do próprio ATP, é limitada. A creatina fosfato e o ATP podem fornecer a energia para uma contração muscular intensa por 5 a 6 s. A velocidade máxima em uma corrida de velocidade pode, portanto, ser mantida por apenas 5 a 6 s (ver Figura 15.7). Por conseguinte, o vencedor de uma corrida de 100 metros é aquele que alcança a maior velocidade inicial e que, em seguida, reduz a sua velocidade ao mínimo.

Durante uma corrida de cerca de 10 segundos, o nível de ATP no músculo cai de 5,2 para 3,7 mM, enquanto o da creatina fosfato diminui de 9,1 para 2,6 mM. A glicólise anaeróbica fornece substrato energético para compensar a perda de ATP e de creatina fosfato. *Uma corrida de velocidade de 100 metros é impulsionada pelas reservas de ATP, creatina fosfato e pela glicólise anaeróbica do glicogênio muscular*. A conversão do glicogênio muscular em lactato pode gerar uma quantidade bem maior de ATP, porém a velocidade é menor que a da transferência de grupos fosforila da creatina fosfato. Devido à glicólise anaeróbica, o nível sanguíneo de lactato aumenta de 1,6 para 8,3 mM. A liberação de H^+ do músculo em atividade intensa reduz concomitantemente o pH do sangue de 7,42 para 7,24. Esse ritmo não pode ser mantido em uma corrida de 1.000 metros (cerca de 132 s) por duas razões: em primeiro lugar, a creatina fosfato é consumida em poucos segundos e, em segundo lugar, o lactato produzido causaria acidose. Por conseguinte, são necessárias fontes alternativas de energia.

A oxidação completa do glicogênio muscular a CO_2 pela respiração aeróbica aumenta substancialmente a energia produzida, porém esse processo aeróbico é muito mais lento do que a glicólise anaeróbica. Todavia, à medida que aumenta a distância de uma corrida, a respiração aeróbica ou fosforilação oxidativa torna-se cada vez mais importante. Por exemplo, *parte do ATP consumido em uma corrida de 1.000 metros deve originar-se da fosforilação oxidativa*. Como o ATP é produzido mais lentamente pela fosforilação oxidativa do que pela glicólise (ver Tabela 27.3), a velocidade do corredor é necessariamente mais lenta do que em uma corrida de velocidade de 100 metros. A velocidade do campeão para a corrida de 1.000 metros é de cerca de 7,6 m s^{-1}, em comparação com aproximadamente 10,4 m s^{-1} para o evento de 100 metros (Figura 27.11).

Tabela 27.3 Fontes de energia para contração muscular.

Fonte de energia	Taxa máxima de produção de ATP (mmol s^{-1})	Valor aproximado (~) de P Total disponível (mmol)
ATP muscular		223

Creatina fosfato	73,3	446
Conversão do glicogênio muscular em lactato	39,1	6.700
Conversão do glicogênio muscular em CO_2	16,7	84.000
Conversão do glicogênio hepático em CO_2	6,2	19.000
Conversão de ácidos graxos do tecido adiposo em CO2	6,7	4.000.000

Nota: Os substratos energéticos armazenados são estimados para um indivíduo de 70 kg, com massa muscular de 28 kg.
Fonte: De E. Hultman and R. C. Harris. Em *Principles of Exercise Biochemistry*, edited by J. R. Poortmans (Karger, 2004), pp.78-119.

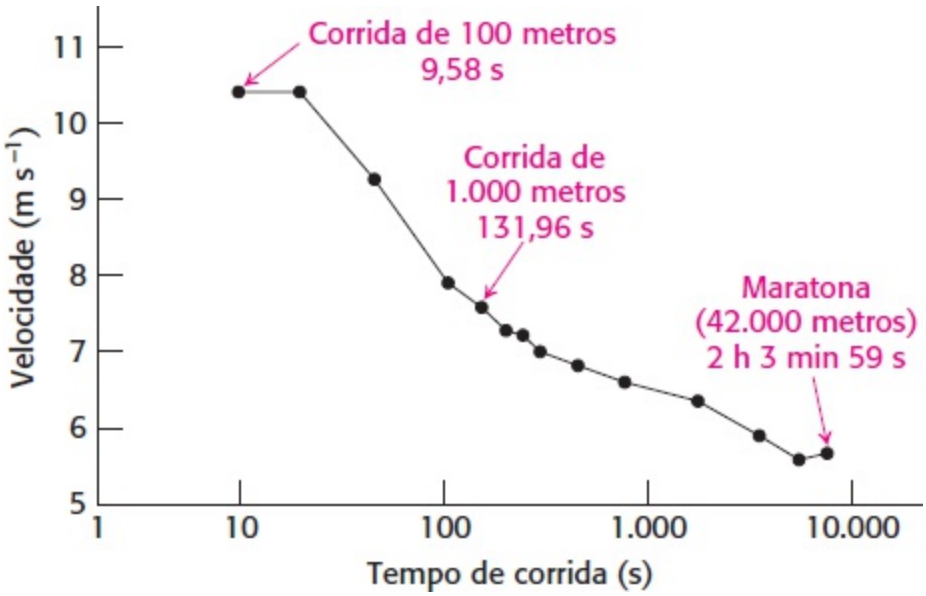


Figura 27.11 Dependência da velocidade da corrida na duração da corrida. Os valores mostrados são recordes mundiais. [Dados de trackanfieldnews.com.]

A corrida de uma maratona (42.200 metros) exige uma seleção diferente de substratos energéticos e caracteriza-se por uma cooperação entre músculo, fígado e tecido adiposo. O glicogênio hepático complementa o glicogênio muscular como reserva de energia que pode ser mobilizada. Todavia, as reservas corporais totais de glicogênio (103 moles de ATP, quando muito) são insuficientes para fornecer os 150 moles de ATP necessários para essa extenuante competição de cerca de 2 h. Quantidades muito maiores de ATP podem ser obtidas da oxidação de ácidos graxos derivados da degradação de *lipídios no tecido adiposo*, porém a taxa máxima de produção de ATP é mais lenta que a da oxidação do glicogênio e é 10 vezes mais lenta que a da creatina fosfato. Por conseguinte, o ATP é produzido muito mais lentamente a partir das reservas de alta capacidade do que das reservas limitadas, explicando as diferentes velocidades dos eventos anaeróbicos e aeróbicos. *A geração de ATP a partir dos ácidos graxos é essencial para a corrida de distância.* As gorduras são rapidamente consumidas em atividades como corridas de distância, explicando por que o exercício aeróbico extenso é benéfico para indivíduos que apresentam resistência à insulina. Entretanto, para um corredor de maratona de elite, as gorduras não podem constituir a única fonte de energia. Os estudos realizados mostraram que, quando o glicogênio muscular está esgotado, a produção de potência do músculo cai para aproximadamente 50% de seu valor máximo. A produção de potência diminui, apesar da disponibilidade de um amplo suprimento de gordura, sugerindo que os lipídios

podem fornecer apenas cerca de 50% do esforço aeróbico máximo. Uma maratona levaria cerca de 6 h se todo o ATP fosse oriundo da oxidação de ácidos graxos, visto que esta é muito mais lenta do que a oxidação do glicogênio. Os melhores corredores consomem quantidades quase iguais de glicogênio e de ácidos graxos durante uma maratona para obter uma velocidade média de 5,5 m s^{-1}, cerca da metade da velocidade de uma corrida de 100 metros. Como é obtida uma mistura ideal desses substratos energéticos? *Um baixo nível de glicemia leva a uma elevada razão glucagon/insulina, que, por sua vez, mobiliza os ácidos graxos do tecido adiposo*. Os ácidos graxos entram prontamente no músculo, onde são degradados por β-oxidação a acetil-CoA e, em seguida, a CO_2. O nível elevado de acetil-CoA diminui a atividade do complexo da piruvato desidrogenase, bloqueando a conversão do piruvato em acetil-CoA. Por conseguinte, a oxidação de ácidos graxos diminui a convergência da glicose para o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa. A glicose é preservada, de modo que permanece uma quantidade suficiente disponível no final da maratona. A utilização simultânea de ambas as fontes de energia proporciona uma velocidade média maior do que a que seria alcançada se o glicogênio fosse totalmente consumido antes do início da oxidação dos ácidos graxos.

Se forem consumidas refeições ricas em carboidratos após a depleção de glicogênio, haverá rápida restauração das reservas de glicogênio. Além disso, a síntese de glicogênio prossegue durante o consumo de refeições ricas em carboidratos, aumentando as reservas de glicogênio bem acima do normal. Esse fenômeno é denominado "supercompensação" ou, mais comumente, sobrecarga de carboidratos.

27.5 A ingestão de alimentos e a inanição induzem alterações metabólicas

Até aqui, analisamos o metabolismo no contexto do consumo excessivo de calorias, como na obesidade, ou em situações de necessidade calórica extrema, como no exercício. Consideremos agora a condição fisiológica oposta – a falta de calorias.

O ciclo de fome-saciedade é a resposta fisiológica ao jejum

Iniciemos com uma condição fisiológica denominada *ciclo de fome-saciedade*, que todos experimentamos nas horas que se seguem após uma ceia e durante o jejum noturno. Esse ciclo noturno de fome-saciedade passa por três estágios: o estado bem alimentado depois de uma refeição, o início do jejum durante a noite e o estado realimentado após o desjejum. Uma importante meta das numerosas alterações bioquímicas que ocorrem nesse período é manter a *homeostasia da gli*cose – isto é, um nível constante de glicemia. A manutenção da homeostasia da glicose é particularmente importante, visto que, normalmente, a glicose constitui a única forma de energia para o cérebro. Conforme discutido anteriormente, o principal defeito do diabetes é a incapacidade de levar a cabo essa tarefa vital. Os dois principais sinais que regulam o ciclo de fome-saciedade são a insulina e o glucagon.

1. *O estado bem alimentado ou pós-prandial*. Depois de consumirmos e digerirmos uma refeição noturna, a glicose e os aminoácidos são transportados do intestino para o sangue. Os lipídios alimentares são acondicionados em quilomícrons e transportados até o sangue pelo sistema linfático.

Essa condição de saciedade leva à secreção de insulina que, em cooperação com o glucagon, mantém a homeostasia da glicose. Em essência, a insulina sinaliza o estado de saciedade; o hormônio estimula o armazenamento de substratos energéticos e a síntese de proteínas de vários modos. A insulina estimula a síntese de glicogênio tanto no músculo quanto no fígado e suprime a gliconeogênese pelo fígado. Ela também acelera a glicólise no fígado, o que, por sua vez, aumenta a síntese de ácidos graxos.

O fígado ajuda a limitar a quantidade de glicose presente no sangue durante o período de fartura armazenando-a como glicogênio, para assim ser capaz de liberar glicose em tempos de escassez. Como o excesso de glicose presente no sangue depois de uma refeição é removido? O fígado é capaz de capturar grandes quantidades de glicose, visto que ele dispõe de uma isoenzima da hexoquinase, denominada *glicoquinase*, que converte a glicose em glicose 6-fosfato, a qual não pode ser transportada para fora da célula. É interessante lembrar que a glicoquinase apresenta um valor alto de K_M, e, portanto, só é ativa quando os níveis de glicemia estão elevados. Além disso, a glicoquinase não é inibida pela glicose 6-fosfato, como ocorre com a hexoquinase. Consequentemente, *o fígado forma glicose 6-fosfato mais rapidamente à medida que aumentam os níveis de glicemia. O aumento da glicose 6-fosfato acoplado à ação da insulina leva a um aumento das reservas de glicogênio*. Os efeitos hormonais sobre a síntese e o armazenamento de glicogênio são reforçados por uma ação direta da própria glicose. *A fosforilase é um sensor de glicose, além de ter seu papel como enzima que cliva o glicogênio*. Quando o nível de glicose está alto, a ligação da glicose à fosforilase *a* torna a enzima suscetível à ação de uma fosfatase, que a converte em fosforilase *b*, que não degrada prontamente o glicogênio (Seção 21.2). Por conseguinte, *a glicose desloca alostericamente o sistema do glicogênio de um modo de degradação para um modo de síntese*.

O nível elevado de insulina no estado de saciedade também promove *a entrada de glicose no músculo e no tecido adiposo*. A insulina estimula a síntese de glicogênio tanto no músculo quanto no fígado. A entrada de glicose no tecido adiposo fornece glicerol 3-fosfato para a síntese de triacilgliceróis. A ação da insulina também se estende ao metabolismo de aminoácidos e de proteínas. A insulina promove a captação de aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina) pelo músculo. Na verdade, a insulina exerce um efeito estimulador geral sobre a síntese de proteínas, o que favorece o acúmulo de proteína muscular. Além disso, ela inibe a degradação intracelular de proteínas.

2. *Estado de jejum inicial ou pós-absortivo*. O nível de glicemia começa a declinar várias horas depois de uma refeição, levando à diminuição de secreção de insulina e à elevação da secreção de glucagon. O glucagon é secretado pelas células α do pâncreas em resposta ao *baixo nível de glicemia durante o jejum*. Assim como a insulina sinaliza o estado de saciedade, o glucagon sinaliza o estado de jejum. O glucagon serve para mobilizar as reservas de glicogênio quando não há ingestão alimentar de glicose. *O principal órgão-alvo do glucagon é o fígado*. O glucagon estimula a degradação de glicogênio e inibe a sua síntese ao deflagrar a cascata de AMP cíclico que leva à fosforilação e ativação da fosforilase e à inibição da glicogênio sintase (Seção 21.5). O glucagon também inibe a síntese de ácidos graxos ao diminuir a produção de piruvato e ao reduzir a atividade da acetil-CoA carboxilase mantendo-a em um estado fosforilado. Além disso, o glucagon estimula a gliconeogênese no fígado e bloqueia a glicólise ao reduzir o nível de F-2,6-BP (ver Figura 27.9).

Todas as ações conhecidas do glucagon são mediadas por proteínas quinases que são ativadas pelo

AMP cíclico. A ativação da cascata do AMP cíclico resulta em nível mais alto de atividade da fosforilase *a* e em nível mais baixo de atividade da glicogênio sintase *a*. O efeito do glucagon sobre essa cascata é reforçado pela baixa concentração de glicose no sangue. A ligação diminuída da glicose à fosforilase *a* torna a enzima menos suscetível à ação hidrolítica da fosfatase. Em vez disso, a fosfatase permanece ligada à fosforilase *a*, e, desse modo, a sintase permanece na forma fosforilada inativa. Consequentemente, ocorre rápida mobilização de glicogênio.

A grande quantidade de glicose formada pela hidrólise da glicose 6-fosfato derivada do glicogênio é então liberada no sangue pelo fígado. A entrada de glicose no músculo e no tecido adiposo diminui em resposta a um baixo nível de insulina. A utilização diminuída de glicose pelo músculo e pelo tecido adiposo também contribui para a manutenção do nível de glicemia. O resultado final dessas ações do glucagon consiste em *aumentar acentuadamente a liberação de glicose pelo fígado*. Tanto o músculo quanto o fígado utilizam ácidos graxos como fonte de energia quando o nível de glicemia cai, poupando a glicose para uso pelo cérebro e pelos eritrócitos. Por conseguinte, *o nível de glicemia é mantido em 4,4 mM (80 mg dl^{-1}) ou acima desse valor por três fatores principais:* (1) *a mobilização de glicogênio e a liberação de glicose pelo fígado*, (2) *a liberação de ácidos graxos pelo tecido adiposo, e* (3) *o desvio do substrato energético usado da glicose para os ácidos graxos pelo músculo e pelo fígado*.

Qual é o resultado da depleção das reservas de glicogênio do fígado? A gliconeogênese a partir do lactato e da alanina continua, porém esse processo simplesmente repõe a glicose que já foi convertida em lactato e alanina pelos tecidos, como o músculo e os eritrócitos. Além disso, o cérebro oxida completamente a glicose a CO_2 e H_2O. Por conseguinte, para que ocorra síntese efetiva de glicose, é necessária uma outra fonte de carbono. O glicerol liberado pelo tecido adiposo durante a lipólise fornece alguns dos átomos de carbono, enquanto os carbonos restantes provêm da hidrólise das proteínas musculares.

3. *O estado realimentado*. Quais são as respostas bioquímicas ao desjejum farto? A gordura é processada exatamente como ela é processada no estado de saciedade normal. Entretanto, isso não ocorre com a glicose. O fígado inicialmente não absorve glicose do sangue, deixando-a para os outros tecidos, e permanece em um modo de gliconeogênese. Todavia, nesse estágio, a glicose recém-sintetizada é utilizada para repor as reservas hepáticas de glicogênio. À medida que os níveis de glicemia aumentam, o fígado completa a reposição de suas reservas de glicogênio e começa a processar o excesso restante de glicose para a síntese de ácidos graxos.

No jejum prolongado (inanição), a degradação de proteínas é minimizada por adaptações metabólicas

Anteriormente, consideramos os resultados metabólicos da superalimentação, uma condição que está se tornando excessivamente comum nas nações prósperas. Examinemos agora o extremo oposto. Quais são as adaptações se o jejum se prolongar até o estado de inanição, uma situação que afeta quase um bilhão de pessoas no mundo inteiro? Um homem típico de 70 kg bem nutrido tem uma reserva energética que totaliza cerca de 670.000 kJ (161.000 kcal; ver Tabela 27.4). A energia necessária para um período de 24 h varia de cerca de 6.700 kJ (1.600 kcal) a 25.000 kJ (6.000 kcal), dependendo do grau de atividade. Por conseguinte, os substratos energéticos armazenados são suficientes para atender às necessidades calóricas na inanição por um período de 1 a 3 meses. Todavia, as reservas de carboidratos se esgotam em apenas um dia.

Tabela 27.4 Reservas energéticas em um homem típico de 70 kg.

Órgão	Energia disponível em quilojoules (kcal)					
	Glicose ou glicogênio		Triacilgliceróis		Proteínas mobilizáveis	
Sangue	250	(60)	20	(45)	0	(0)
Fígado	1.700	(400)	2.000	(450)	1.700	(400)
Cérebro	30	(8)	0	(0)	0	(0)
Músculo	5.000	(1.200)	2.000	(450)	100.000	(24.000)
Tecido adiposo	330	(80)	560.000	(135.000)	170	(40)

Fonte: De G. F. Cahill, Jr. *Clin. Endocrinol. Metab*. 5(1976):398.

Mesmo em condições de inanição, o nível de glicemia precisa ser mantido acima de 2,2 mM (40 mg dl^{-1}). *A primeira prioridade do metabolismo na inanição é fornecer uma quantidade de glicose suficiente ao cérebro e a outros tecidos (como os eritrócitos) que dependem absolutamente dessa fonte de energia*. Todavia, os precursores da glicose não estão presentes em quantidades abundantes. A maior parte da energia está armazenada na fração de ácidos graxos dos triacilgliceróis. Entretanto, convém lembrar que os ácidos graxos não podem ser convertidos em glicose, visto que a acetil-CoA resultante da degradação de ácidos graxos não pode ser transformada em piruvato (p. 660). A fração glicerol dos triacilgliceróis pode ser convertida em glicose, porém apenas uma quantidade limitada está disponível. A única outra fonte potencial de glicose é constituída pelos esqueletos de carbono de aminoácidos derivados da degradação de proteínas. Entretanto, as proteínas não são armazenadas, de modo que qualquer degradação resultará em perda de função. Por conseguinte, *a segunda prioridade do metabolismo na inanição consiste em preservar as proteínas, e essa preservação é efetuada pelo desvio do substrato energético usado, da glicose para ácidos graxos e corpos cetônicos* (Figura 27.12).

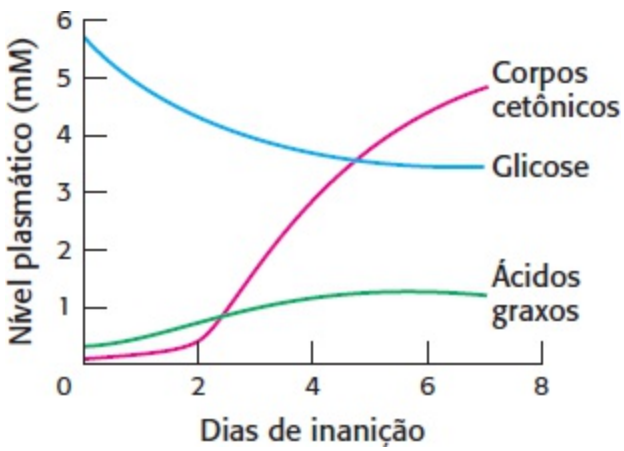


Figura 27.12 Escolha da fonte de energia durante a inanição. Os níveis plasmáticos de ácidos graxos e de corpos cetônicos aumentam na inanição, enquanto os de glicose diminuem.

As alterações metabólicas durante o primeiro dia de inanição assemelham-se às que ocorrem

depois de um jejum noturno. O baixo nível de glicemia induz a diminuição da secreção de insulina e aumento da secreção de glucagon. *Os processos metabólicos predominantes consistem na mobilização de triacilgliceróis do tecido adiposo e gliconeogênese pelo fígado*. *O fígado obtém a energia para suas próprias necessidades pela oxidação de ácidos graxos liberados do tecido adiposo*. Consequentemente, as concentrações de acetil CoA e de citrato aumentam, interrompendo a glicólise. A captação de glicose pelo músculo diminui acentuadamente, em virtude do baixo nível de insulina, enquanto os ácidos graxos entram livremente. Por conseguinte, *o músculo não utiliza glicose e depende exclusivamente dos ácidos graxos como fonte de energia*. A β-oxidação dos ácidos graxos pelo músculo interrompe a conversão do piruvato em acetil-CoA, visto que esta última estimula a fosforilação do complexo da piruvato desidrogenase, tornando-o inativo (Seção 17.3). Por conseguinte, o piruvato, o lactato e a alanina são exportados para o fígado para a sua conversão em glicose. O glicerol derivado da clivagem dos triacilgliceróis constitui outra matéria-prima para a síntese hepática de glicose.

A proteólise também fornece esqueletos de carbono para a gliconeogênese. Durante a inanição, não há reposição das proteínas degradadas, que servem como fontes de carbono para a síntese de glicose. As fontes iniciais de proteínas são aquelas que sofrem rápida renovação, como as proteínas do epitélio intestinal e das secreções do pâncreas. A proteólise das proteínas musculares fornece alguns dos precursores de três carbonos da glicose. Entretanto, a sobrevida para a maioria dos animais depende de sua capacidade de se mover rapidamente, o que exige uma grande massa muscular, de modo que a perda muscular deve ser minimizada.

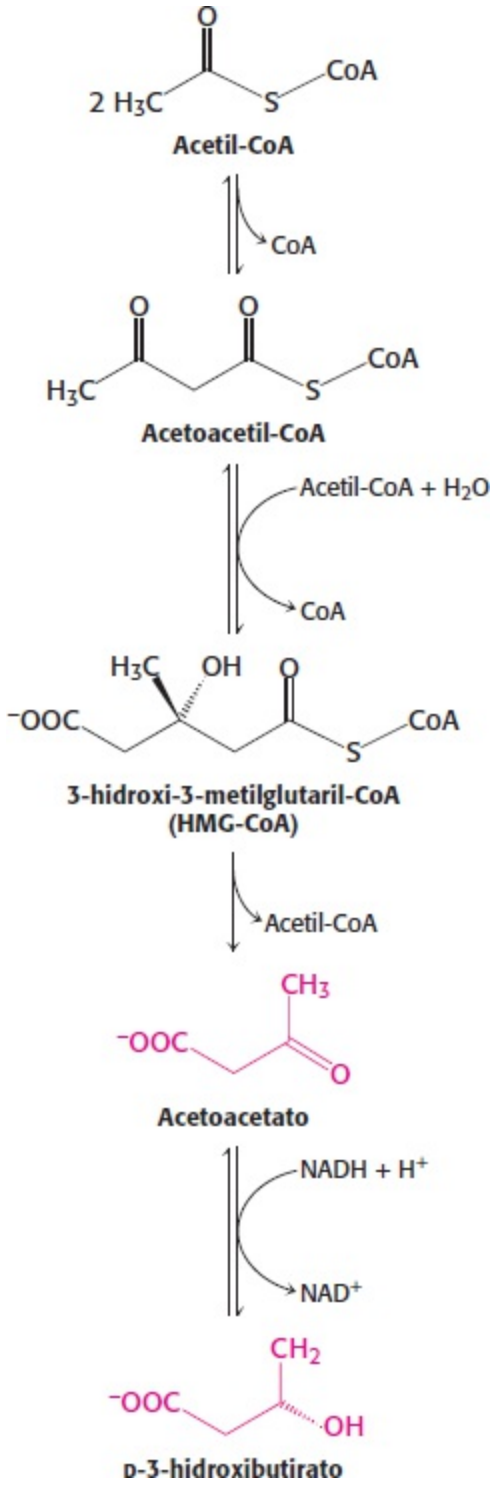


Figura 27.13 Síntese de corpos cetônicos pelo fígado.

Tabela 27.5 Metabolismo energético na inanição.

	Quantidade formada ou consumida em 24 h (gramas)	
Trocas e consumo de substratos energéticos	3º dia	40º dia
Substrato energético utilizado pelo cérebro		
Glicose	100	40
Corpos cetônicos	50	100

Todos os outros usos da glicose	50	40
Mobilização dos substratos energéticos		
Lipólise no tecido adiposo	180	180
Degradação da proteína muscular	75	20
Liberação de substratos energéticos do fígado		
Glicose	150	80
Corpos cetônicos	150	150

Como a perda de músculo é restrita? Depois de cerca de 3 dias de inanição, o fígado forma grandes quantidades de acetoacetato e de D-3-hidroxibutirato (corpos cetônicos; Figura 27.13). A sua síntese a partir da acetil-CoA aumenta acentuadamente, visto que o ciclo do ácido cítrico é incapaz de oxidar todas as unidades de acetila geradas pela degradação dos ácidos graxos. A gliconeogênese esgota o suprimento de oxaloacetato, que é essencial para a entrada de acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico. Como consequência, o fígado produz grandes quantidades de corpos cetônicos, que são liberados no sangue. Nesse estágio, *o cérebro começa a consumir quantidades significativas de acetoacetato em lugar de glicose*. Depois de 3 dias de inanição, cerca de 25% das necessidades energéticas do cérebro são supridos pelos corpos cetônicos (Tabela 27.5). O coração também utiliza corpos cetônicos como fonte de energia.

Depois de algumas semanas de inanição, os corpos cetônicos tornam-se a principal fonte de energia do cérebro. O acetoacetato é ativado pela transferência de CoA da succinil-CoA, produzindo acetoacetil-CoA (Figura 27.14). A seguir, a clivagem pela tiolase produz duas moléculas de acetil-CoA, que entram no ciclo do ácido cítrico. Em essência, *os corpos cetônicos são equivalentes de ácidos graxos, que constituem uma fonte de energia acessível para o cérebro*. Apenas 40 g de glicose são então necessários por dia para o cérebro, em comparação com cerca de 120 g no primeiro dia de inanição. *A conversão efetiva de ácidos graxos em corpos cetônicos pelo fígado e a sua utilização pelo cérebro diminuem acentuadamente a necessidade de glicose. Por conseguinte, ocorre degradação de menos músculo do que nos primeiros dias de inanição*. A degradação de 20 g de músculo por dia em comparação com 75 g no início da inanição é de suma importância para a sobrevida. O tempo de sobrevivência de um indivíduo é principalmente determinado pelo tamanho de depósito de triacilgliceróis.

O que acontece após a depleção das reservas de triacilgliceróis? A única fonte de energia continua sendo a proteína. A degradação de proteínas é acelerada, e a morte resulta inevitavelmente da perda das funções cardíaca, hepática ou renal.

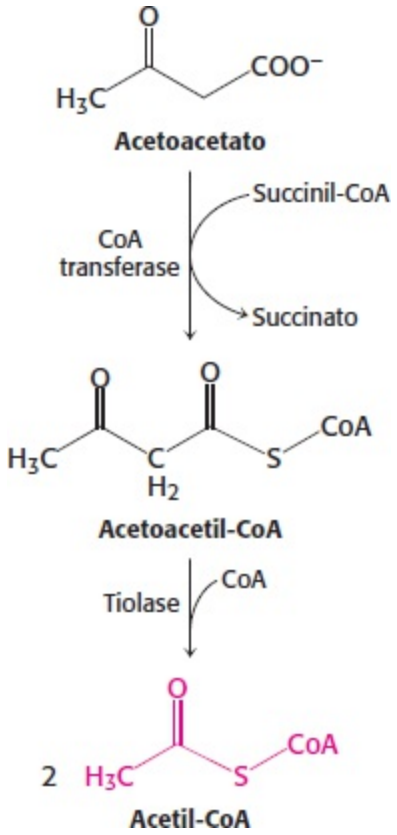


Figura 27.14 Entrada de corpos cetônicos no ciclo do ácido cítrico.

27.6 O etanol altera o metabolismo energético no fígado

O etanol vem sendo parte da alimentação humana há séculos. Entretanto, o seu consumo em excesso pode resultar em diversos problemas de saúde, mais notavelmente lesão hepática. Qual é a base bioquímica desses problemas de saúde?

O metabolismo do etanol induz a excesso de NADH

O etanol não pode ser excretado e precisa ser metabolizado, principalmente pelo fígado. Esse metabolismo ocorre por duas vias, a primeira delas compreende duas etapas. A primeira etapa, catalisada pela enzima *álcool desidrogenase* ocorre no citoplasma:

$$\underset{\text{Etanol}}{CH_3CH_2OH} + NAD^+ \xrightarrow[\text{desidrogenase}]{\text{Álcool}} \underset{\text{Acetaldeído}}{CH_3CHO} + NADH + H^+$$

A segunda etapa, catalisada pela aldeído desidrogenase, ocorre nas mitocôndrias.

$$\underset{\text{Acetaldeído}}{CH_3CHO} + NAD^+ + H_2O \xrightarrow[\text{desidrogenase}]{\text{Aldeído}} \underset{\text{Acetato}}{CH_3COO^-} + NADH + H^+$$

Observe que *o consumo de etanol leva ao acúmulo de NADH*. Essa alta concentração de NADH, inibe a gliconeogênese, pois impede a oxidação do lactato a piruvato. Com efeito, as altas concentrações de NADH determinarão o predomínio da reação inversa, com acúmulo de lactato. As

consequências podem ser hipoglicemia e acidose láctica.

A fartura de NADH também inibe a oxidação de ácidos graxos. O propósito metabólico da oxidação de ácidos graxos é gerar NADH para a produção de ATP pela fosforilação oxidativa, porém as necessidades de NADH do indivíduo que consome álcool são supridas pelo metabolismo do etanol. Com efeito, o excesso de NADH sinaliza que as condições estão corretas para a síntese de ácidos graxos. Como consequência, há acúmulo de triacilgliceróis no fígado, o que causa uma condição conhecida como "fígado gorduroso" ou esteatose hepática, que é exacerbada nos indivíduos obesos. Os efeitos bioquímicos do consumo de etanol podem ser muito rápidos. Por exemplo, a gordura acumula-se no fígado dentro de poucos dias de consumo moderado de álcool. Esse acúmulo é reversível com a diminuição do consumo de álcool.

A segunda via para o metabolismo de etanol é denominada *sistema microssômico de oxidação do etanol* (MEOS, do inglês *microssomal ethanol-oxidizing system*) induzível pelo etanol. Essa via dependente do citocromo P450 (Seção 26.4) produz acetaldeído e, subsequentemente, acetato, enquanto oxida o poder redutor de biossíntese NADPH, a $NADP^+$. Essa via, pelo fato de utilizar oxigênio, gera radicais livres, que causam lesão dos tecidos. Além disso, como o sistema consome NADPH, não pode haver regeneração do antioxidante glutationa (Seção 20.5), exacerbando o estresse oxidativo.

Quais são os efeitos dos outros metabólitos do etanol? As mitocôndrias hepáticas podem converter o acetato em acetil-CoA, em uma reação que necessita de ATP. A enzima é a tioquinase, que normalmente ativa os ácidos graxos de cadeia curta.

$$\text{Acetato} + \text{coenzima A} + \text{ATP} \rightarrow \text{acetil-CoA} + \text{AMP} + PP_i$$

$$PP_i \rightarrow 2\ P_i$$

Entretanto, o processamento posterior da acetil-CoA pelo ciclo do ácido cítrico é bloqueado, visto que o NADH inibe duas enzimas reguladoras importantes do ciclo do ácido cítrico – a isocitrato desidrogenase e a α-cetoglutarato desidrogenase. O acúmulo de acetil-CoA tem várias consequências. Primeiramente, haverá formação de corpos cetônicos, que são liberados no sangue, agravando a acidose já decorrente das altas concentrações de lactato. O processamento do acetato no fígado torna-se ineficiente, levando ao acúmulo de acetaldeído. Esse composto muito reativo forma ligações covalentes com muitos grupos funcionais importantes nas proteínas, comprometendo a sua função. Se o etanol for consistentemente consumido em altos níveis, o acetaldeído pode lesionar o fígado de modo significativo, provocando finalmente morte celular.

A lesão hepática causada pelo consumo excessivo de etanol ocorre em três estágios. O primeiro estágio, já mencionado, consiste no desenvolvimento de esteatose hepática. No segundo estágio – hepatite alcoólica– grupos de células morrem e, como consequência, ocorre inflamação. Esse estágio por si só pode ser fatal. No terceiro estágio – cirrose – são produzidas estruturas fibrosas e tecido cicatricial ao redor das células mortas. A cirrose compromete muitas das funções bioquímicas do fígado. O fígado cirrótico é capaz de converter a amônia em ureia, e ocorre elevação dos níveis sanguíneos de amônia, a qual é tóxica para o sistema nervoso e pode causar coma e morte. A cirrose hepática surge em cerca de 25% dos alcoólicos, e cerca de 75% de todos os casos de cirrose hepática resultam do alcoolismo. A hepatite viral constitui uma causa não alcoólica de cirrose hepática.

O consumo de etanol em excesso prejudica o metabolismo de vitaminas

Os efeitos adversos do etanol não se limitam a seu próprio metabolismo. A vitamina A (retinol) é convertida em ácido retinoico, uma importante molécula sinalizadora para o crescimento e o desenvolvimento dos vertebrados, pelas mesmas desidrogenases que metabolizam o etanol. Em consequência, essa ativação não ocorre na presença de etanol, que atua como inibidor competitivo. Além disso, o sistema MEOS induzido pelo etanol inativa o ácido retinoico. Acredita-se que essas perturbações na via de sinalização do ácido retinoico sejam responsáveis, pelo menos em parte, pela síndrome alcoólica fetal, bem como pelo desenvolvimento de uma variedade de tipos de câncer.

A perturbação do metabolismo da vitamina A constitui um resultado direto das alterações bioquímicas induzidas pelo consumo excessivo de etanol. Outros distúrbios do metabolismo resultam de outra característica comum dos alcoólicos – a desnutrição. Os alcoólicos frequentemente bebem em lugar de se alimentar. Um grave distúrbio neurológico, denominado *síndrome de Korsakoff*, resulta do aporte insuficiente da vitamina tiamina. Os sintomas incluem confusão mental, marcha instável e ausência de habilidades motoras finas e se assemelham aos sintomas do beribéri (Seção 17.4), visto que ambas as condições resultam da falta de tiamina. A tiamina é convertida na coenzima tiamina pirofosfato, um constituinte essencial do complexo de piruvato desidrogenase. Convém lembrar que esse complexo liga a glicólise ao ciclo do ácido cítrico. Perturbações nesse complexo da piruvato desidrogenase são mais evidentes na forma de distúrbios neurológicos, já que o cérebro normalmente depende da glicose para a geração de energia.

Em certas ocasiões, observa-se a ocorrência de escorbuto alcoólico, em virtude da ingestão insuficiente de vitamina C, vitamina necessária para a formação de fibras estáveis de colágeno. Os sintomas do escorbuto incluem lesões cutâneas e fragilidade dos vasos sanguíneos, e os mais notáveis são o sangramento da gengiva, a perda de dentes e as infecções periodontais. As gengivas são particularmente sensíveis à falta de vitamina C, visto que o colágeno nas gengivas sofre rápida renovação. Qual é a base bioquímica do escorbuto? A vitamina C é necessária para a atividade continuada da prolil-hidroxilase. Essa enzima sintetiza a 4-hidroxiprolina, um aminoácido necessário no colágeno. Para formar esse aminoácido incomum, os resíduos de prolina no lado amino dos resíduos de glicina nas cadeias nascentes do colágeno sofrem hidroxilação. Um átomo de oxigênio do O_2 liga-se ao C-4 da prolina, enquanto o outro átomo de oxigênio é captado pelo α-cetoglutarato, que é convertido em succinato (Figura 27.15). Essa reação é catalisada pela *prolil-hidroxilase*, uma *dioxigenase*, que necessita de um íon Fe^{2+} para ativar o O_2. A enzima também converte o α-cetoglutarato em succinato sem hidroxilar a prolina. Nessa reação parcial, forma-se um complexo de ferro oxidado, que inativa a enzima. Como a enzima ativa é regenerada? O *ascorbato* (*vitamina C*) vem em socorro reduzindo o íon férrico da enzima inativada. No processo de recuperação, o ascorbato é oxidado a ácido desidroascórbico (Figura 27.16). Por conseguinte, o ascorbato atua, aqui, como um *antioxidante* específico. Por que a hidroxilação prejudicada tem essas consequências devastadoras? *O colágeno sintetizado na ausência de ascorbato é menos estável do que a proteína normal*. A hidroxiprolina estabiliza a tripla hélice do colágeno, formando pontes de hidrogênio entre as fitas. As fibras anormais formadas pelo colágeno insuficientemente hidroxilado são responsáveis pelos sintomas do escorbuto.

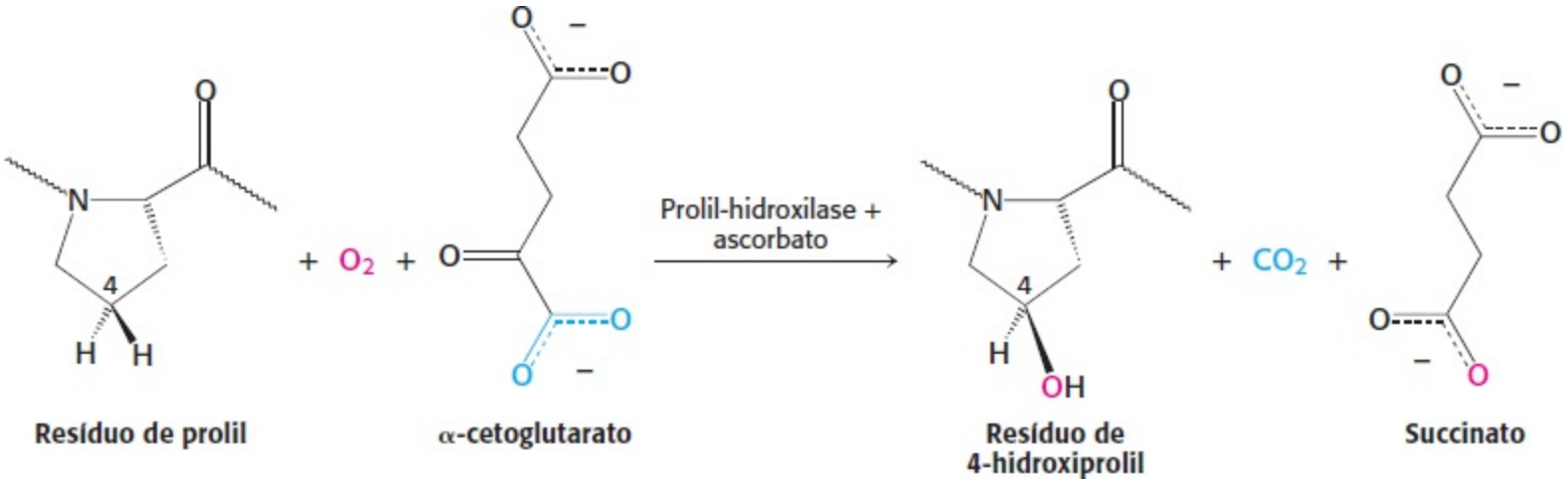


Figura 27.15 Formação da 4-hidroxiprolina. A prolina é hidroxilada em C-4 pela ação da prolil-hidroxilase, uma enzima que ativa o oxigênio molecular.

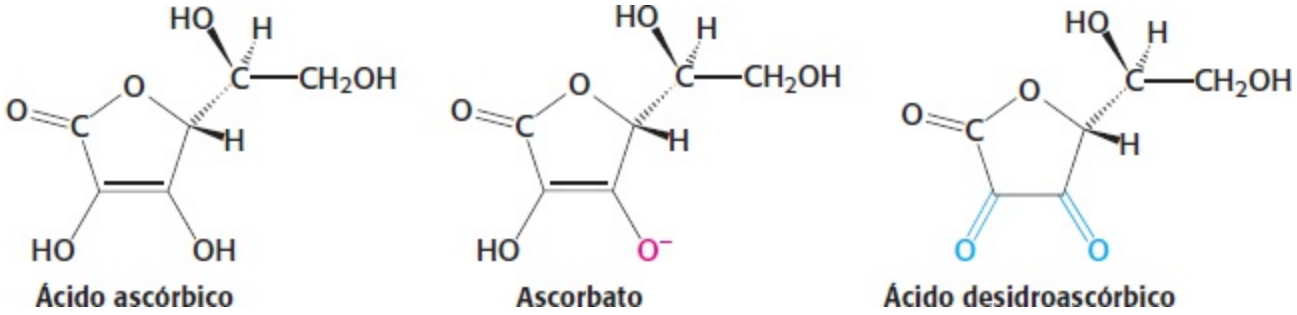


Figura 27.16 Formas de ácido ascórbico (vitamina C). O ascorbato é a forma ionizada da vitamina C, enquanto o ácido desidroascórbico é a forma oxidada do ascorbato.

Resumo

27.1 A homeostasia calórica constitui um meio de regular o peso corporal

Muitas pessoas são capazes de manter o peso corporal quase constante durante toda a vida adulta. Essa capacidade é a demonstração da homeostasia calórica, uma condição fisiológica em que as necessidades de energia correspondem ao aporte energético. Quando o aporte energético é maior do que as necessidades de energia, ocorre ganho de peso. Nos países desenvolvidos, a obesidade assumiu proporções epidêmicas e está implicada como fator que contribui para inúmeras condições patológicas.

27.2 O cérebro desempenha um papel essencial na homeostasia calórica

Várias moléculas de sinalização atuam no cérebro para controlar o apetite. Os sinais a curto prazo, como a CCK e GLP-1, transmitem sinais de saciedade ao cérebro enquanto o indivíduo está se alimentando. Os sinais a longo prazo incluem a leptina e a insulina. A leptina, que é secretada pelo tecido adiposo em proporção direta à massa de tecido adiposo, é uma indicação das reservas de gordura. A leptina inibe a ingestão de alimentos. A insulina também atua no cérebro, sinalizando a disponibilidade de carboidratos.

A leptina atua por meio de sua ligação a um receptor presente nos neurônios cerebrais, que dá início a vias de transdução de sinais que reduzem o apetite. Pode ocorrer obesidade em indivíduos com quantidades normais de leptina e de seu receptor, sugerindo que esses

indivíduos são resistentes à leptina. Os supressores da sinalização de citocinas podem inibir a sinalização da leptina, resultando em resistência à leptina e desenvolvimento de obesidade.

27.3 O diabetes é uma doença metabólica comum, que frequentemente resulta da obesidade

O diabetes constitui a doença metabólica mais comum no mundo. Ocorre diabetes tipo 1 quando a insulina está ausente, devido à destruição autoimune das células β do pâncreas. O diabetes tipo 2 caracteriza-se por níveis normais ou mais altos de insulina, porém os tecidos-alvo da insulina, notavelmente o músculo, não respondem ao hormônio, uma condição denominada resistência à insulina. A obesidade constitui um fator predisponente significativo para o diabetes tipo 2.

No músculo, as gorduras em excesso acumulam-se no indivíduo obeso. Essas gorduras são processadas em segundos mensageiros, que ativam vias de transdução de sinais que inibem a sinalização da insulina, com consequente desenvolvimento de resistência à insulina. A resistência à insulina nos tecidos-alvo acaba resultando em insuficiência das células β do pâncreas. O pâncreas procura compensar a falta de ação da insulina ao sintetizar uma maior quantidade do hormônio, resultando em estresse do RE e ativação subsequente das vias apoptóticas que levam à morte das células β.

O diabetes tipo 1 é devido a perturbações metabólicas, resultando em insuficiência de insulina e excesso de glucagon relativo às necessidades do indivíduo. O resultado consiste em níveis elevados de glicemia, mobilização de triacilgliceróis e formação excessiva de corpos cetônicos. A formação acelerada de corpos cetônicos pode levar à acidose, ao coma e à morte em diabéticos insulinodependentes sem tratamento.

27.4 O exercício físico altera beneficamente a bioquímica das células

O exercício constitui uma prescrição útil para a resistência à insulina e o diabetes tipo 2. A atividade muscular estimula a biogênese mitocondrial de modo dependente de cálcio. O aumento na quantidade de mitocôndrias facilita a oxidação de ácidos graxos no músculo, resultando em aumento da sensibilidade à insulina.

A escolha da fonte de energia no exercício é determinada pela intensidade e duração do exercício. A corrida de velocidade e a maratona são impulsionadas por diferentes fontes de energia para maximizar a produção de potência. A corrida de 100 metros é impulsionada pelo ATP armazenado, pela creatina fosfato e pela glicólise anaeróbica. Por outro lado, a oxidação do glicogênio muscular e dos ácidos graxos provenientes do tecido adiposo é essencial na maratona, uma competição altamente aeróbica.

27.5 A ingestão de alimentos e a inanição induzem alterações metabólicas

A insulina sinaliza o estado de saciedade; ela estimula a formação de glicogênio e de triacilgliceróis, bem como a síntese de proteínas. Em contrapartida, o glucagon sinaliza um baixo nível de glicemia; ele estimula a degradação do glicogênio e a gliconeogênese pelo fígado e hidrólise dos triacilgliceróis pelo tecido adiposo. Depois de uma refeição, a elevação dos níveis de glicemia leva a um aumento da secreção de insulina e diminuição da secreção de glucagon. Em consequência, o glicogênio é sintetizado no músculo e no fígado. Quando o nível de glicemia cai várias horas mais tarde, a glicose é então formada pela degradação do

glicogênio e pela via gliconeogênica, e os ácidos graxos são liberados pela hidrólise de triacilgliceróis. A seguir, o fígado e o músculo utilizam cada vez mais ácidos graxos em lugar de glicose para suprir suas próprias necessidades energéticas, de modo que a glicose seja poupada para uso pelo cérebro e pelos eritrócitos.

As adaptações metabólicas na inanição servem para minimizar a degradação de proteínas. Grandes quantidades de corpos cetônicos são formadas pelo fígado a partir de ácidos graxos, e a sua liberação no sangue ocorre dentro de poucos dias após o início da inanição. Depois de várias semanas de inanição, os corpos cetônicos tornam-se a principal fonte de energia para o cérebro. A necessidade diminuída de glicose reduz a taxa de degradação muscular, de modo que a probabilidade de sobrevivência aumenta.

27.6 O etanol altera o metabolismo energético no fígado

A oxidação do etanol resulta em uma superprodução desregulada de NADH, que tem várias consequências. A elevação nos níveis de ácido láctico e de corpos cetônicos provoca queda do pH sanguíneo ou acidose. Ocorre lesão hepática, visto que o excesso de NADH causa a formação de lipídios em excesso, bem como a geração de acetaldeído, uma molécula reativa. Como consequência, pode ocorrer lesão hepática grave.

Palavras-chave

ciclo de fome-saciedade (p. 813)
colecistocinina (CCK) (p. 801)
diabetes tipo 1 (p. 805)
diabetes tipo 2 (p. 805)
estresse do retículo endoplasmático (RE) (p. 808)
homeostasia calórica (homeostasia energética) (p. 797)
homeostasia da glicose (p. 813)
insulina (p. 802)
leptina (p. 802)
peptídio semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) (p. 801)
resistência à insulina (p. 805)
resistência à leptina (p. 803)
resposta às proteínas não enoveladas (p. 808)
síndrome metabólica (p. 806)

Questões

1. *Gordura de depósito*. O tecido adiposo era antigamente considerado apenas como um local de armazenamento de gordura. Por que esse conceito não é mais considerado correto?

2. *Ação equilibrada*. O que significa homeostasia calórica?

3. *Dupla dinâmica*. Quais são os hormônios-chave responsáveis pela manutenção da homeostasia calórica?

4. *Duplo papel*. Quais são os dois papéis bioquímicos desempenhados pela CCK? Pela GLP-1?

5. *Falha na comunicação*. A leptina inibe a ingestão de alimentos e é secretada em quantidades diretamente proporcionais à gordura corporal. Além disso, os indivíduos obesos apresentam quantidades normais de leptina e de seu receptor. Por que, então, as pessoas tornam-se obesas?

6. *Muitos sinais*. Faça corresponder as características (1 a 9) ao hormônio apropriado (a–f).

1. Secretado(a) pelo tecido adiposo
2. Estimula a gliconeogênese hepática
3. Via de GPCR
4. Sinal de saciedade
5. Aumenta a secreção de insulina
6. Secretado(a) pelo pâncreas durante o jejum
7. Secretado(a) depois de uma refeição
8. Estimula a síntese de glicogênio
9. Ausente no diabetes tipo 1

(a) leptina

(b) adiponectina

(c) GLP-1

(d) CCK

(e) insulina

(f) glucagon

7. *Uma substância química fundamental*. Quais são as fontes de glicose 6-fosfato nas células hepáticas?

8. *Nenhuma das opções é boa*. Diferencie o diabetes melito tipo 1 do tipo 2.

9. *Combatendo o diabetes*. A leptina é considerada um hormônio "antidiabetogênico". Explique.

10. *Energia e potencia metabólicas*. A taxa de gasto energético de uma pessoa típica de 70 kg em repouso é de cerca de 70 watts (W), como a de uma lâmpada elétrica.

(a) Expresse essa taxa em quilojoules por segundo e em quilocalorias por segundo.

(b) Quantos elétrons fluem através da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial por segundo nessas condições?

(c) Faça uma estimativa da taxa correspondente de produção de ATP.

(d) O teor total de ATP do organismo é de cerca de 50 g. Faça uma estimativa da frequência de renovação de uma molécula de ATP em um indivíduo em repouso.

11. *Quociente respiratório (QR)*. Esse índice metabólico clássico é definido como o volume de CO_2 liberado, dividido pelo volume de O_2 consumido.

(a) Calcule os valores do QR para a oxidação completa da glicose e do tripalmitoil glicerol.

(b) O que as medidas dos QR revelam acerca das contribuições de diferentes fontes de energia durante o exercício intenso? (Suponha que a degradação de proteínas seja insignificante.)

12. *Corcova de camelo*. Compare a produção de H_2O a partir da oxidação completa de 1 g de glicose com aquela de 1 g de tripalmitoil glicerol. Relacione esses valores com a seleção evolutiva do conteúdo de uma corcova de camelo.

13. *Faminto-nutrido*. O que o ciclo de fome-saciedade significa?

14. *É claro que o excesso é ruim*. Quais são os principais meios de processar o etanol?

15. *Começou com vinho Borgonha, mas logo passou para bebidas mais pesadas*. Descreva os três estágios do consumo do etanol que levam à lesão hepática e, possivelmente, à morte.

16. *O preço do pecado*. Quanto tempo uma pessoa tem de correr para compensar as calorias obtidas com a ingestão de 10 macadâmias (75 kJ ou 18 kcal, por noz)? (Suponha um aumento de potência de consumo de 400 W.)

17. *Doce risco*. Ingerir grandes quantidades de glicose antes de uma maratona poderia parecer uma boa maneira de aumentar as reservas de energia. Entretanto, corredores experientes não ingerem glicose antes de uma corrida. Qual é a razão bioquímica para evitar essa fonte potencial de energia? (Dica: considere o efeito da ingestão de glicose sobre o nível de insulina.)

18. *Lipodistrofia*. A lipodistrofia é uma condição em que o indivíduo carece de tecido adiposo. Os músculos e o fígado desses indivíduos são resistentes à insulina, e ambos os tecidos acumulam grandes quantidades de triacilglicerídios (hiperlipidemia). A administração de leptina melhora, em parte, essa condição. O que isso indica acerca da relação do tecido adiposo com a ação da insulina?

19. *Alvo terapêutico*. Qual seria o efeito de uma mutação no gene da PTP1B (proteína tirosina fosfatase 1B) que inativou a enzima em um indivíduo com diabetes tipo 2?

20. *Um efeito do diabetes*. O diabetes insulinodependente é frequentemente acompanhado de hipertrigliceridemia, que é um excesso de triacilgliceróis no sangue, na forma de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL, do inglês *very low density lipoproteins)*. Sugira uma explicação bioquímica.

21. *Compartilhando a riqueza*. O hormônio glucagon significa um estado de jejum; todavia, ele inibe a glicólise no fígado. Como essa inibição de uma via de produção de energia beneficia o organismo?

22. *Compartimentalização*. A glicólise ocorre no citoplasma, enquanto a degradação de ácidos graxos é observada nas mitocôndrias. Que vias metabólicas dependem da interação de reações que ocorrem em ambos os compartimentos?

23. *Kwashiorkor*. O k*washiorkor*, que constitui a forma mais comum de desnutrição de crianças no mundo, é causado por uma alimentação com muitas calorias, porém com pouca proteína. Os altos níveis de carboidratos resultam em níveis elevados de insulina. Qual é o efeito dos níveis elevados de insulina sobre

(a) a utilização de lipídios?

(b) o metabolismo de proteínas?

(c) Crianças que sofrem de *kwashiorkor* frequentemente apresentam um grande abdome distendido causado pela água do sangue que extravasa para os espaços extracelulares. Sugira uma base bioquímica para essa condição.

24. *Um por todos, todos por um*. Como o metabolismo do fígado é coordenado com o músculo esquelético durante o exercício vigoroso?

25. *Uma ajudinha, por favor?* Qual é a vantagem de converter piruvato em lactato no músculo esquelético?

26. *Escolha da fonte de energia*. Qual a principal fonte de energia no músculo em repouso? Qual a principal fonte de energia do músculo em condições de intenso trabalho?

27. *Árdua recompensa*. Os atletas de resistência algumas vezes seguem o seguinte programa de exercícios e alimentação: 7 dias antes de uma competição, praticam exercícios exaustivos, de modo a esgotar todas as reservas, exceto as de glicogênio. Nos próximos 2 a 3 dias, consomem poucos carboidratos e praticam exercícios de intensidade baixa a moderada. Por fim, 3 a 4 dias antes da competição, consomem alimentos ricos em carboidratos. Explique os benefícios desse regime.

28. *Déficit de oxigênio*. Após um exercício de intensidade leve, o oxigênio consumido na recuperação é aproximadamente igual ao déficit de oxigênio, que é a quantidade adicional de oxigênio que teria sido consumida se o consumo de oxigênio alcançasse imediatamente o estado de equilíbrio dinâmico. Como o oxigênio consumido na recuperação é utilizado?

29. *Excessivo consumo de oxigênio após o exercício*. O oxigênio consumido após o término de um exercício vigoroso é significativamente maior do que o déficit de oxigênio e é denominado consumo excessivo de oxigênio após o exercício (EPOC, do inglês *excess post-exercise oxygen consumption*). Por que é necessária uma quantidade muito maior de oxigênio depois de um exercício intenso?

30. *Efeitos psicotrópicos*. O etanol é um composto incomum, visto que ele é livremente solúvel tanto na água quanto nos lipídios; por esse motivo, tem acesso a todas as regiões do cérebro altamente vascularizado. Embora a base molecular da ação do etanol no cérebro não esteja esclarecida, é evidente que ele influencia diversos receptores de neurotransmissores e canais iônicos. Sugira uma explicação bioquímica para os diversos efeitos do etanol.

31. *Tipo de fibra*. O músculo esquelético tem vários tipos distintos de fibras. O tipo I é utilizado principalmente para a atividade aeróbica, enquanto o tipo II é utilizado para períodos curtos e intensos de atividades. Como você poderia distinguir esses tipos de fibras musculares se pudesse examiná-los ao microscópio eletrônico?

32. *Tour de France*. Os ciclistas no Tour de France (mais de 4.000 km em 3 semanas) requerem cerca de 836.000 kJ (200.000 kcal) de energia ou 41.840 kJ (10.000 kcal) dia^{-1} (um homem em repouso necessita de cerca de 8.368 kJ ou 2.000 kcal dia^{-1}.

(a) Com base na suposição de que a produção de energia do ATP é de cerca de 50,2 kJ (12 kcal) mol^{-1}, e que o ATP tem um peso molecular de 503 g mol^{-1}, quanto ATP deve ser gasto por um ciclista

no Tour de France?

(b) O ATP puro pode ser adquirido ao custo de aproximadamente US$150 por grama. Quanto custaria impulsionar um ciclista pelo Tour de France se todo o ATP tivesse de ser comprado?

33. *Reserva*. Suponha que a mulher descrita no início do capítulo tenha ganho 25 kg entre 25 e 65 anos, e que o seu peso aos 65 anos seja de 79 kg. Calcule quantas calorias em excesso ela consumiu por dia para ganhar 25 kg durante 40 anos. Suponhamos que essa mulher tenha 1,67 m de altura. Qual é o seu IMC? Ela seria considerada obesa com 79 kg?

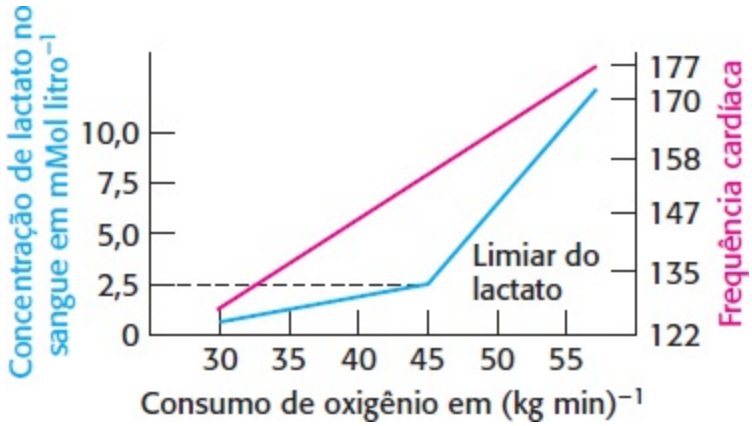
34. *Respondendo ao estresse*. Por que, fisiologicamente, faz sentido que períodos regulares de exercício prolongado resultem em biogênese mitocondrial?

35. *Em excesso*. Qual é a relação entre a oxidação dos ácidos graxos e a resistência à insulina no músculo?

36. *Aneurina? Mesmo?* Por que os sintomas do beribéri assemelham-se aos da síndrome de Wernicke-Korsakoff?

Questões Interpretação de dados

37. *Limiar do lactato*. O gráfico mostra a relação entre os níveis de lactato no sangue, o consumo de oxigênio e a frequência cardíaca durante um exercício de intensidade crescente. Os valores para o consumo de oxigênio e a frequência cardíaca são indicadores do grau de esforço.

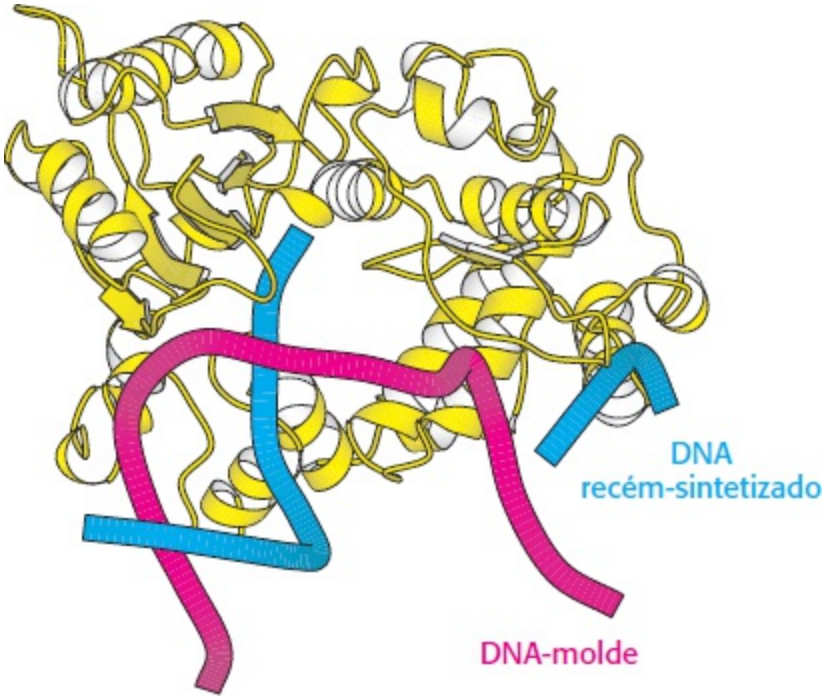


(a) Por que há produção de certa quantidade de lactato mesmo quando o exercício é moderado?

(b) Bioquimicamente, o que ocorre quando a concentração de lactato começa a aumentar rapidamente, um ponto denominado limiar do lactato?

(c) Os atletas de resistência medem algumas vezes os níveis sanguíneos de lactato durante o treinamento para conhecer o valor do limiar do lactato. Em seguida, durante as competições, correm exatamente nesse limiar ou abaixo até o final da corrida. Bioquimicamente, por que essa prática é sensata?

(d) O treinamento pode aumentar o limiar do lactato. Explique.



A cópia fiel é essencial para o armazenamento da informação genética. Com a precisão de um monge diligente copiando um manuscrito iluminado, a DNA polimerase (acima) copia fitas de DNA, preservando a sequência precisa de bases com muito poucos erros. [Fotografia à esquerda, The Pierpont Morgan Library/Art Resource.]

SUMÁRIO

28.1 A replicação do DNA ocorre pela polimerização de trifosfatos de desoxirribonucleosídios ao longo de um molde

28.2 O desenrolamento e o superespiralamento do DNA são controlados por topoisomerases

28.3 A replicação do DNA é altamente coordenada

28.4 Muitos tipos de dano ao DNA podem ser reparados

28.5 A recombinação do DNA desempenha papéis importantes na replicação, no reparo e em outros processos

Talvez o aspecto mais fascinante da estrutura do DNA deduzida por Watson e Crick tenha sido, como eles próprios expressaram, que "o pareamento específico que postulamos sugere imediatamente um possível mecanismo de cópia para o material genético". Uma dupla-hélice separada em duas fitas simples pode ser replicada, visto que cada fita serve como molde sobre o qual a fita complementar pode ser montada (Figura 28.1). Para preservar a informação codificada no DNA ao longo de numerosas divisões celulares, a cópia da informação genética precisa ser extremamente fiel. Para replicar o genoma humano sem erros, é preciso ter uma taxa de erro inferior a 1 pb por 3×10^9 pb. Essa notável acurácia é obtida por meio de um sistema de múltiplas etapas de síntese acurada de DNA (cuja taxa de erro é de 1 por 10^3 a 10^4 bases inseridas), revisão durante a síntese de DNA (o que reduz essa taxa de erro para aproximadamente 1 por 10^6 a 10^7 pb) e reparo de pareamento impróprio (o que reduz a taxa de erro para aproximadamente 1 por 10^9 a 10^{10} pb).

Mesmo após o DNA ter sido inicialmente replicado, o genoma ainda não é seguro. Embora o DNA seja acentuadamente robusto, a luz ultravioleta, bem como uma variedade de espécies químicas, pode danificar o DNA, introduzindo mudanças na sua sequência (mutações) ou lesões que podem bloquear

uma replicação posterior (Figura 28.2). Todos os organismos contêm sistemas de reparo de DNA que detectam danos e que atuam para preservar a sequência original. A ocorrência de mutações em genes que codificam componentes dos sistemas de reparo do DNA constitui um fator essencial no desenvolvimento do câncer. Entre os tipos potencialmente mais devastadores de lesão do DNA estão as quebras de fita dupla do DNA. Com a quebra de ambas as fitas da dupla-hélice em uma determinada região, nenhuma delas fica intacta para atuar como molde para a futura síntese de DNA. Um mecanismo empregado para o reparo dessas lesões baseia-se na recombinação do DNA – isto é, a redistribuição de sequências de DNA presentes em duas duplas-hélices diferentes. Além de seu papel no reparo do DNA, a recombinação é crucial para a geração da diversidade genética na meiose. A recombinação também é fundamental para gerar um repertório altamente diverso de genes para moléculas essenciais do sistema imune (Capítulo 34).

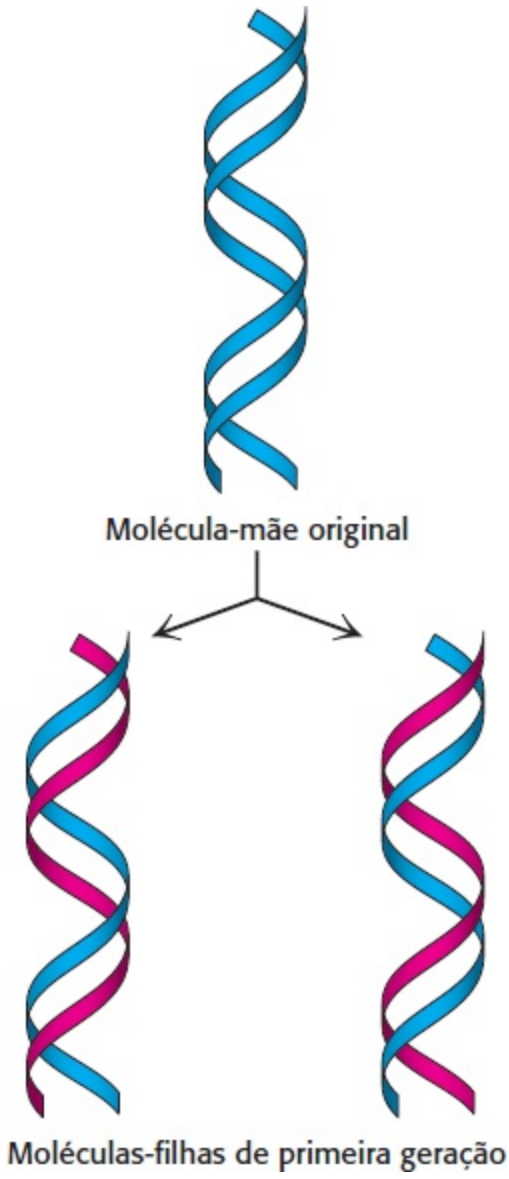


Figura 28.1 Replicação do DNA. Cada fita de uma dupla-hélice (mostrada em azul) atua como molde para a síntese de uma nova fita complementar (mostrada em vermelho).

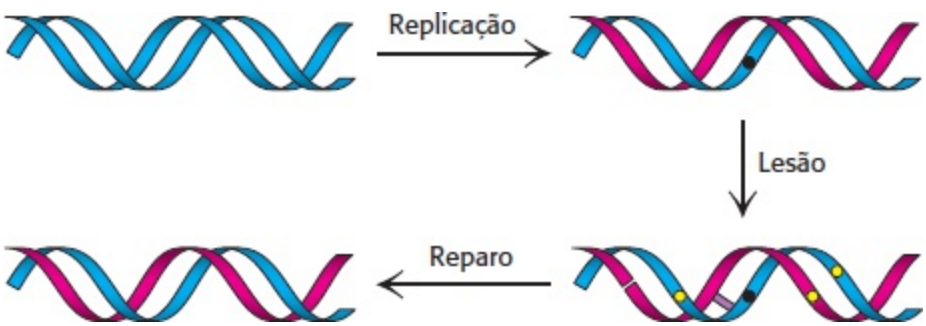


Figura 28.2 Replicação, lesão e reparo do DNA. Alguns erros (mostrados como pontos pretos) podem surgir nos processos de replicação. Outros defeitos (mostrados em amarelo), incluindo bases modificadas, ligações cruzadas e quebras de fitas simples e duplas, são introduzidos no DNA por reações lesivas subsequentes do DNA. Muitos dos erros são detectados e, em seguida, reparados.

28.1 A replicação do DNA ocorre pela polimerização de trifosfatos de desoxirribonucleosídios ao longo de um molde

As sequências de bases do DNA recém-sintetizado precisam corresponder fielmente às sequências do DNA original. Para obter uma replicação fiel, cada fita dentro da dupla-hélice original atua como *molde* para a síntese de uma nova fita de DNA com sequência complementar. As unidades estruturais para a síntese das novas fitas consistem em trifosfatos de desoxirribonucleosídios, que são acrescentados, um de cada vez, à extremidade 3′ de uma fita existente de DNA.

Embora essa reação seja, em princípio, muito simples, ela é significativamente complicada por características específicas da dupla-hélice de DNA. Em primeiro lugar, as duas fitas da dupla-hélice correm em sentidos opostos. Como a síntese da fita de DNA ocorre sempre na direção de 5′ para 3′, o processo de replicação do DNA precisa de mecanismos especiais para acomodar as fitas com sentidos opostos. Em segundo lugar, as duas fitas da dupla-hélice interagem uma com a outra, de modo que as bases, os moldes essenciais para a replicação, estejam no interior da hélice. Por conseguinte, as duas fitas precisam estar separadas uma da outra para gerar moldes apropriados. Por fim, as duas fitas da dupla-hélice enrolam-se uma ao redor da outra. Assim, a separação das fitas também exige o desenrolamento da dupla-hélice. Esse desenrolamento cria super-hélices que precisam ser desfeitas à medida que a replicação prossegue. Iniciaremos com uma análise da química subjacente à formação da estrutura fosfodiéster do DNA recém-sintetizado.

As DNA polimerases necessitam de um molde e de um *primer* (iniciador)

As *DNA polimerases* catalisam a formação de cadeias polinucleotídicas. Cada trifosfato de nucleosídio que chega forma inicialmente um par de bases apropriado com uma base do molde. Só então a DNA polimerase liga a base que chega com a predecessora na cadeia. Por conseguinte, as *DNA polimerases são enzimas direcionadas por um molde*.

As DNA polimerases acrescentam nucleotídios à extremidade 3′ de uma cadeia polinucleotídica. A polimerase catalisa o ataque nucleofílico pelo grupo hidroxila 3′ terminal da cadeia polinucleotídica no grupo α-fosforila do trifosfato de nucleosídio a ser acrescentado (ver Figura 4.25). Para iniciar essa reação, as DNA polimerases necessitam de um *primer* (iniciador) já pareado com o molde com um grupo hidroxila 3′ livre. Elas não podem começar do zero pela adição de nucleotídios a um molde de DNA de fita simples livre. Em contrapartida, a RNA polimerase pode iniciar a síntese de RNA

sem a necessidade de *primer*, como veremos no Capítulo 29.

***Primer* (iniciador)**

O segmento inicial de um polímero que deve ser ampliado e do qual depende o alongamento.

Molde

Uma sequência de DNA ou RNA que dirige a síntese de uma sequência complementar.

Todas as DNA polimerases exibem características estruturais em comum

As estruturas tridimensionais de várias DNA polimerases já são conhecidas. A primeira dessas estruturas foi elucidada por Tom Steitz e colaboradores, que determinaram a estrutura do denominado *fragmento Klenow* da DNA polimerase I de *E. coli* (Figura 28.3). Esse fragmento constitui duas partes principais da enzima integral, incluindo a unidade de polimerase. Essa unidade tem o formato aproximado de uma mão direita, com domínios designados como dedos, polegar e palma. Além da polimerase, o fragmento de Klenow inclui um domínio com atividade de *exonuclease* 3′ → 5′, que participa na revisão e na correção do produto polinucleotídico.

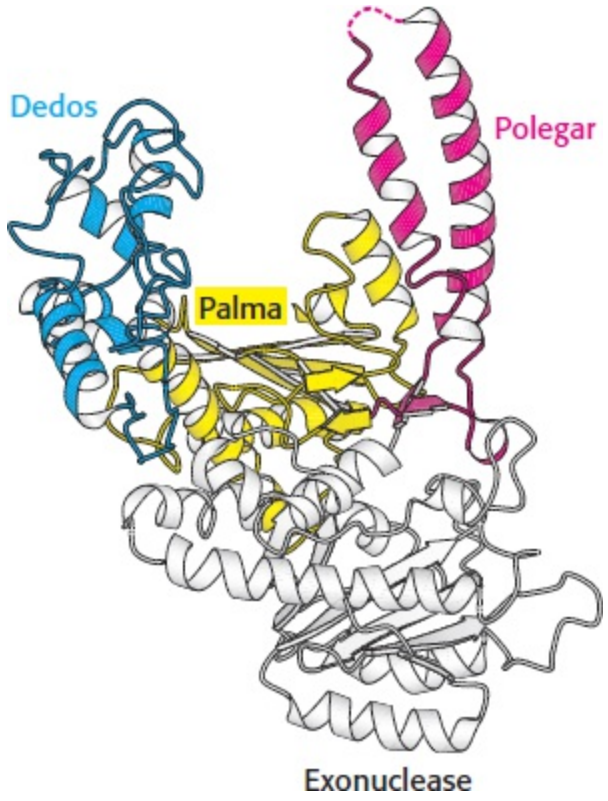


Figura 28.3 Estrutura da DNA polimerase. A primeira estrutura determinada da DNA polimerase foi a de um fragmento da DNA polimerase I de *E. coli*, denominado fragmento Klenow. *Observe* que, à semelhança de outras DNA polimerases, a unidade de polimerase assemelha-se a uma mão direita com dedos (em azul), palma (em amarelo) e polegar (em vermelho). O fragmento Klenow também inclui um domínio de exonuclease que remove bases nucleotídicas incorretas. [Desenhada a partir de 1DPI.pdb.]

As DNA polimerases são notavelmente semelhantes no seu formato global, embora exibam diferenças substanciais em seus detalhes. Foram identificadas pelo menos cinco classes estruturais; algumas delas são claramente homólogas, enquanto outras parecem ser produtos de evolução convergente. Em todos os casos, os domínios de dedos e polegar enrolam-se ao redor do

DNA e o mantêm através do sítio ativo da enzima, que compreende resíduos principalmente do domínio da palma. Além disso, todas as DNA polimerases utilizam estratégias semelhantes para catalisar a reação da polimerase, recorrendo a um mecanismo no qual participam dois íons metálicos.

Dois íons metálicos ligados participam na reação da polimerase

À semelhança de todas as enzimas com substratos de trifosfato de nucleosídio, as DNA polimerases necessitam de íons metálicos para a sua atividade. O exame das estruturas das DNA polimerases com substratos e análogos de substratos ligados revela a presença de dois íons metálicos no sítio ativo. Um íon metálico liga-se tanto ao trifosfato de desoxinucleosídio (dNTP) quanto à hidroxila 3′ do iniciador, enquanto o outro interage apenas com o dNTP (Figura 28.4). Os dois íons metálicos são ligados pelos grupos carboxilato de dois resíduos de aspartato no domínio palma da polimerase. Essas cadeias laterais mantêm os íons metálicos nas posições e orientações apropriadas. O íon metálico ligado ao iniciador ativa o grupo hidroxila 3′ do iniciador, facilitando o seu ataque ao grupo α-fosforila do substrato dNTP no sítio ativo. Os dois íons metálicos juntos ajudam a estabilizar a carga negativa que se acumula no estado de transição pentacoordenado. O íon metálico inicialmente ligado ao dNTP estabiliza a carga negativa no produto pirofosfato.

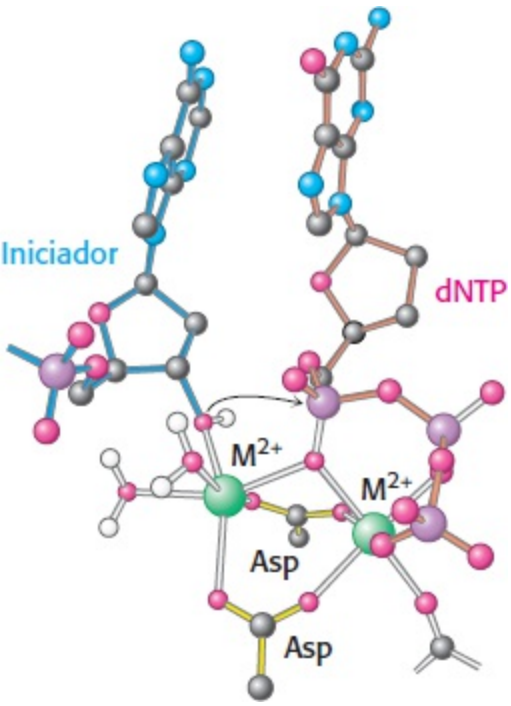


Figura 28.4 Mecanismo da DNA polimerase. Dois íons metálicos (tipicamente, Mg^{2+}) participam na reação da DNA polimerase. Um íon metálico coordena o grupo hidroxila 3′ do *primer* (iniciador), enquanto o outro íon metálico interage apenas com o dNTP. O grupo fosforila do trifosfato de nucleosídio faz uma ponte entre os dois íons metálicos. O grupo hidroxila do iniciador ataca o grupo fosforila, formando uma nova ligação O-P.

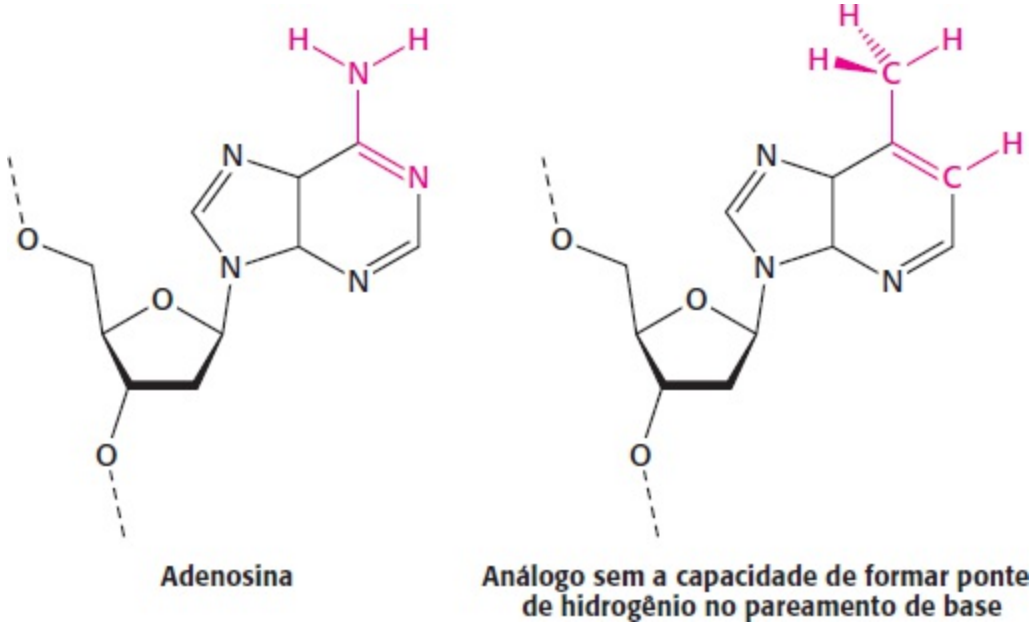


Figura 28.5 Complementaridade de forma. O análogo de bases à direita tem a mesma forma que a adenosina, porém os grupos que formam pontes de hidrogênio entre os pares de bases foram substituídos por grupos (mostrados em vermelho) sem capacidade de fazer pontes de hidrogênio. Entretanto, estudos revelaram que, quando incorporado à fita-molde, esse análogo dirige a inserção da timidina na replicação do DNA.

A especificidade da replicação é determinada pela complementaridade de forma entre as bases

O DNA precisa ser replicado com alta fidelidade. Cada base acrescentada à cadeia em crescimento deve, com alta probabilidade, ser o complemento de Watson-Crick da base na posição correspondente na fita-molde. A ligação do dNTP contendo a base apropriada é favorecida pela formação de um par de bases com o seu parceiro na fita-molde. Embora a ponte de hidrogênio contribua para a formação desse par de bases, a complementaridade global de forma é crucial. Alguns estudos mostraram que um nucleotídio com uma base cuja forma é muito semelhante à adenina mas que carece da capacidade de formar pontes de hidrogênio no pareamento de bases ainda pode dirigir a incorporação de timidina, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Figura 28.5).

Um exame das estruturas cristalinas de várias DNA polimerases revela por que a complementaridade da forma é tão importante. Em primeiro lugar, resíduos da enzima formam pontes de hidrogênio com *o lado do sulco menor do par de bases no sítio ativo* (Figura 28.6). No sulco menor, os aceptores de pontes de hidrogênio estão presentes nas mesmas posições para todos os pares de bases de Watson-Crick. Essas interações atuam como "régua", que mede se houve formação de um par de bases apropriadamente espaçado no sítio ativo.

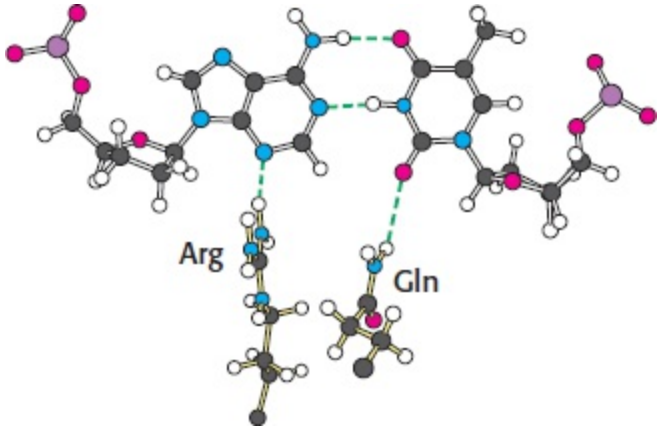


Figura 28.6 Interações no sulco menor. As DNA polimerases doam duas pontes de hidrogênio a pares de bases no sulco menor. Existem aceptores de pontes de hidrogênio nessas duas posições para todos os pares de bases de Watson-Crick, incluindo o par de bases A-T mostrado.

Em segundo lugar, as DNA polimerases fecham-se ao redor do dNTP que chega (Figura 28.7). A ligação de um trifosfato de desoxirribonucleosídio no sítio ativo de uma DNA polimerase desencadeia a mudança conformacional: o domínio dos dedos sofre rotação, formando uma bolsa apertada na qual se encaixa prontamente apenas um par de bases de formato apropriado. Muitos dos resíduos que revestem essa bolsa são importantes para assegurar a eficiência e a fidelidade da síntese de DNA. Por exemplo, a mutação de um resíduo de tirosina conservada que forma parte da bolsa resulta em uma polimerase que está aproximadamente 40 vezes mais sujeita a erro do que a polimerase original.

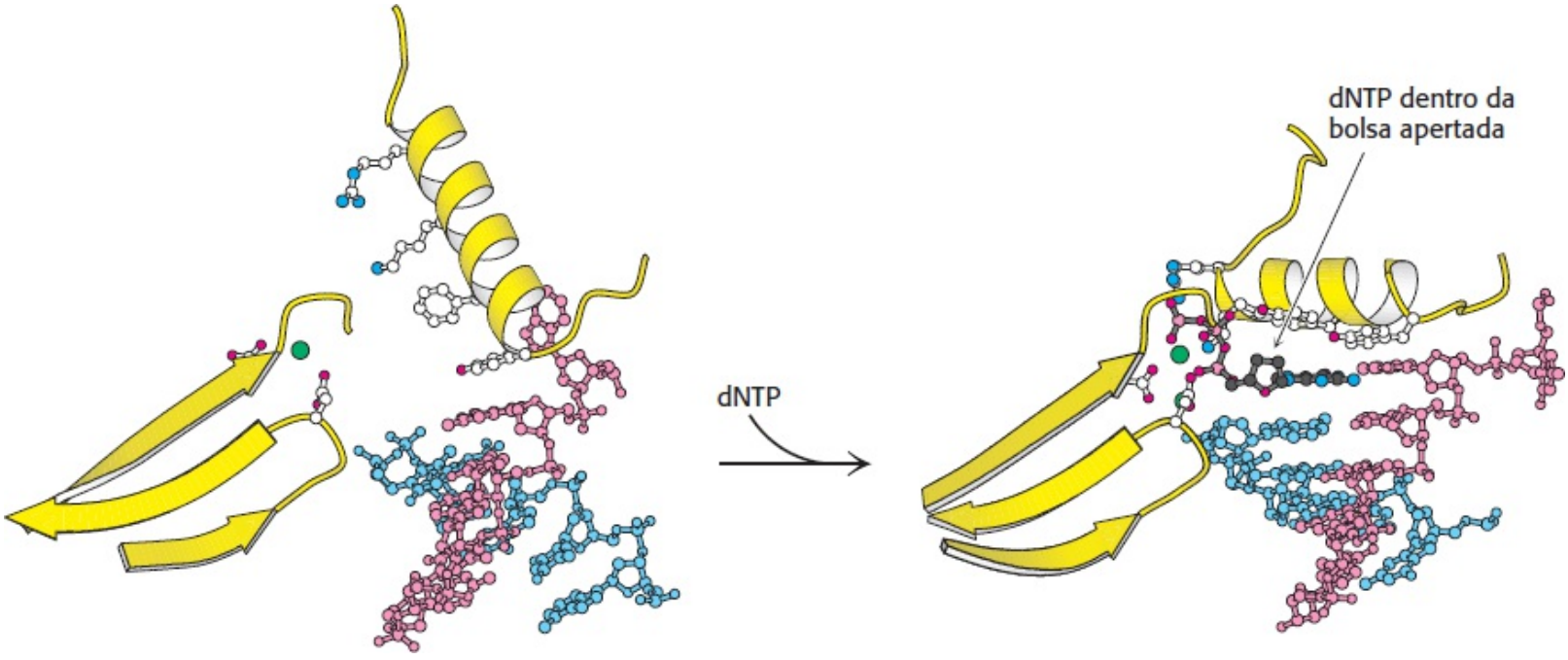


Figura 28.7 Seletividade de forma. A ligação de um trifosfato de desoxirribonucleosídio (dNTP) à DNA polimerase induz mudança conformacional, produzindo uma bolsa apertada para o par de bases constituído pelo dNTP e seu parceiro na fita-molde. Essa mudança conformacional só é possível quando o dNTP corresponde ao parceiro de Watson-Crick da base do molde. [Desenhada a partir de 2BDP. pdb e 1T7P.pdb.]

Um RNA iniciador (*primer*) sintetizado pela primase possibilita o início da síntese de DNA

As DNA polimerases são incapazes de iniciar a síntese de DNA sem um iniciador (*primer*), um

trecho de ácido nucleico com uma extremidade 3′ livre que forma uma dupla-hélice com o molde. Como esse iniciador é formado? Um importante indício veio da observação de que a síntese de RNA é essencial para o início da síntese de DNA. Com efeito, *o RNA inicia a síntese de DNA*. Uma RNA polimerase, denominada *primase*, sintetiza um fragmento curto de RNA (cerca de cinco nucleotídios), que é complementar a uma das fitas do molde de DNA (Figura 28.8). A primase, à semelhança de outras RNA polimerases, pode iniciar a síntese sem um iniciador. Uma vez iniciada a síntese de DNA, o fragmento curto de RNA é removido por hidrólise e substituído por DNA.

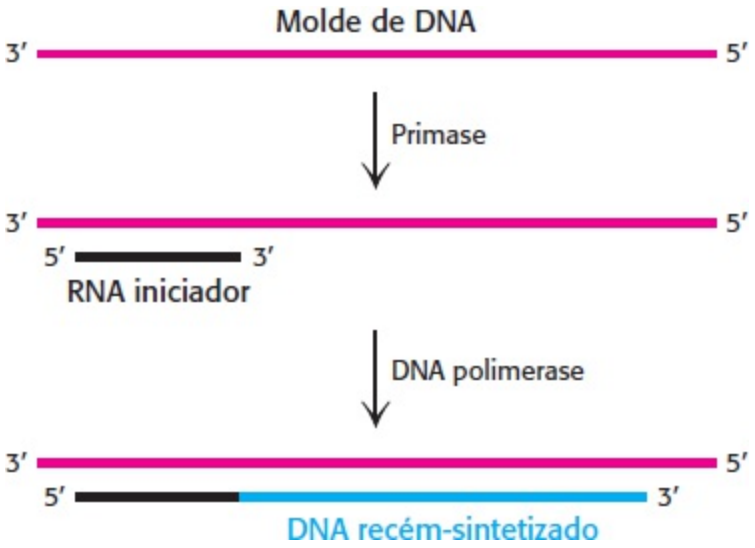


Figura 28.8 ***Priming***. A replicação do DNA é iniciada por um fragmento curto de RNA, que é sintetizado pela primase, uma RNA polimerase. O RNA iniciador é removido em um estágio posterior da replicação.

Uma fita de DNA é formada continuamente, enquanto a outra fita é sintetizada em fragmentos

Ambas as fitas do DNA original servem como moldes para a síntese de novo DNA. O local de síntese de DNA é denominado *forquilha de replicação*, visto que o complexo formado pelas hélices-filhas recém-sintetizadas que surgem a partir do dúplex original assemelha-se a uma forquilha. É importante lembrar que as duas fitas são antiparalelas, isto é, correm em sentidos opostos. Durante a replicação do DNA, ambas as fitas-filhas parecem, à primeira vista, crescer no mesmo sentido. Entretanto, todas as DNA polimerases conhecidas sintetizam o DNA na direção 5′ → 3′, mas não na direção 3′ → 5′. Como então uma das fitas-filhas de DNA parece crescer na direção 3′ → 5′?

Esse dilema foi solucionado por Reiji Okazaki, que descobriu que *uma proporção significativa do DNA recém-sintetizado existe na forma de pequenos fragmentos*. Essas unidades de quase mil nucleotídios (denominados *fragmentos de Okazaki*) estão presentes por pouco tempo na vizinhança da forquilha de replicação (Figura 28.9).

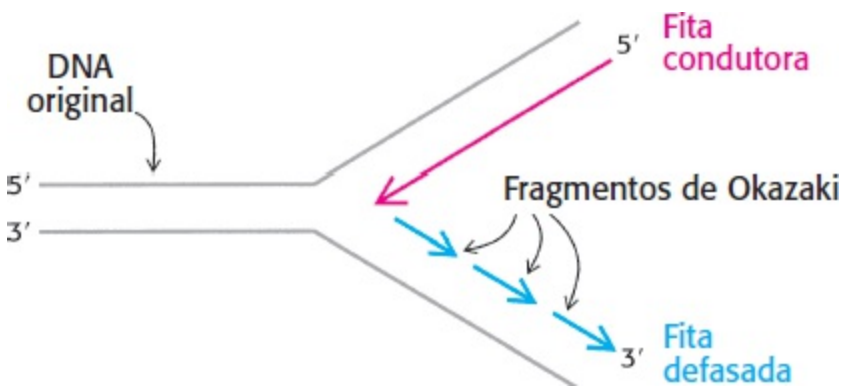


Figura 28.9 Fragmentos de Okazaki. Na forquilha de replicação, ambas as fitas são sintetizadas no sentido 5′ → 3′. A fita condutora é sintetizada continuamente, enquanto a fita defasada é sintetizada em fragmentos curtos, denominados fragmentos de Okazaki.

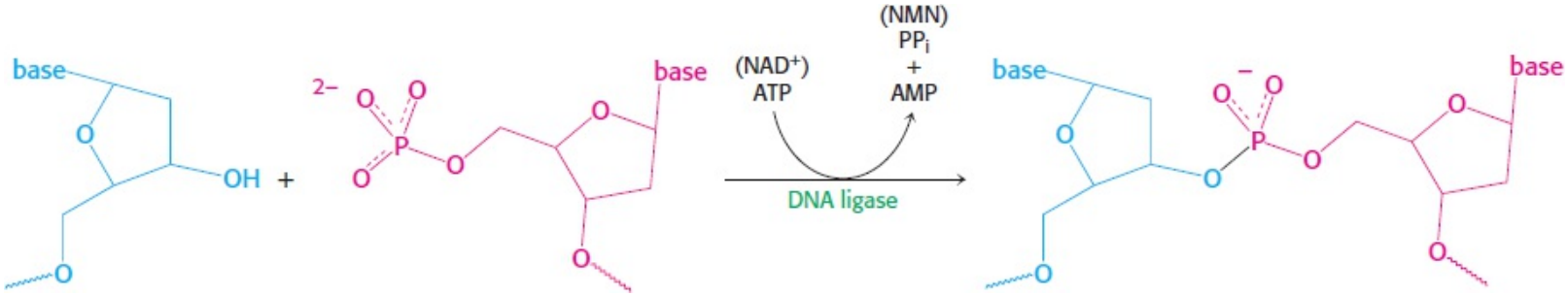


Figura 28.10 Reação da DNA ligase. A DNA ligase catalisa a ligação de uma fita de DNA com um grupo hidroxila 3′ livre a outra com grupo 5′-fosforil livre. Nos eucariotos e nos *Archaea*, o ATP é clivado a AMP e PP_i para impulsionar essa reação. Nas bactérias, o NAD^+ é clivado a AMP e nicotinamida mononucleotídio (NMN).

À medida que a replicação prossegue, esses fragmentos unem-se de modo covalente pela ação da enzima DNA ligase, formando uma fita-filha contínua. A outra fita nova é sintetizada de modo contínuo. A fita formada pelos fragmentos de Okazaki é denominada *fita defasada*, enquanto aquela sintetizada sem interrupção é a *fita condutora*. A montagem descontínua da fita defasada possibilita a polimerização 5′ → 3′ no nível dos nucleotídios, dando origem ao crescimento geral no sentido 3′ → 5′.

A DNA ligase une as extremidades do DNA em regiões dúplex

A união dos fragmentos de Okazaki exige uma enzima que catalisa a união das extremidades de duas cadeias de DNA. A existência de moléculas de DNA circular também aponta para a existência desse tipo de enzima. Em 1967, cientistas de vários laboratórios descobriram simultaneamente a *DNA ligase*. *Essa enzima catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster entre o grupo hidroxila 3 na extremidade de uma cadeia de DNA e o grupo 5'-fosforila na extremidade da outra* (Figura 28.10). É necessária uma fonte de energia para impulsionar essa reação termodinamicamente ascendente. Nos eucariotos e *Archaea*, o ATP constitui a fonte de energia. Nas bactérias, o NAD^+ tipicamente desempenha esse papel.

A DNA ligase não tem a capacidade de unir duas moléculas de DNA de fita simples ou de fechar um DNA de fita simples. Com efeito, *a ligase fecha quebras em moléculas de DNA de fita dupla*. A enzima de *E. coli* habitualmente só forma uma ponte fosfodiéster se houver pelo menos algumas bases de DNA de fita simples na extremidade de um fragmento de fita dupla que possam se unir àquelas de outro fragmento para formar pares de bases. A ligase codificada pelo bacteriófago T4 é capaz de

ligar dois fragmentos de dupla-hélice de extremidade “cega”, uma capacidade que é explorada na tecnologia do DNA recombinante.

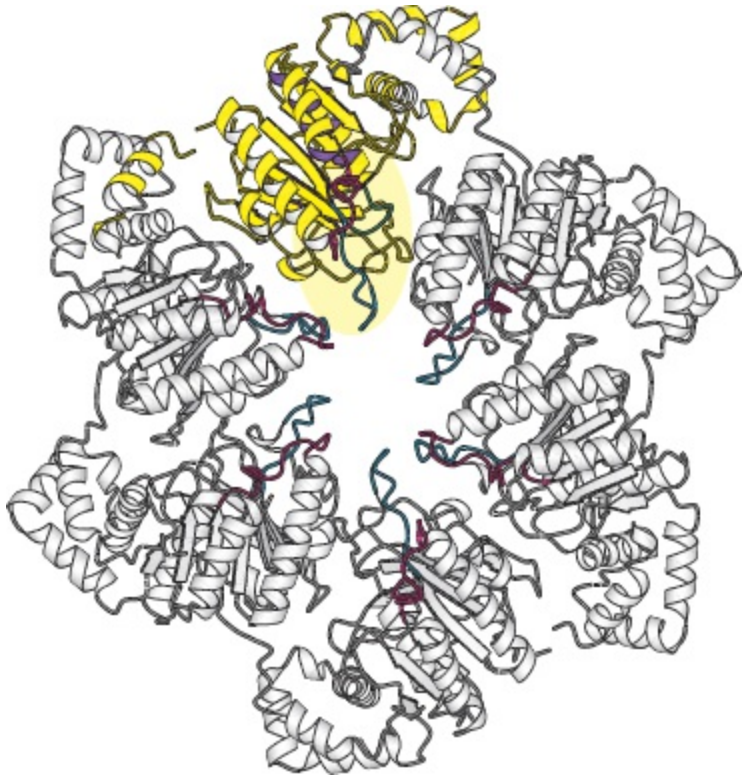
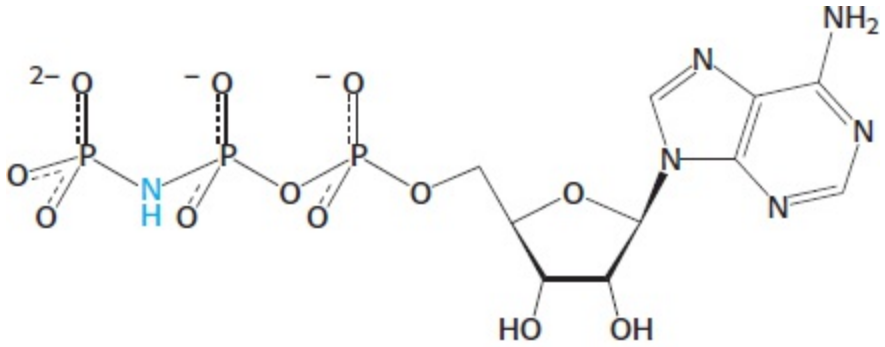


Figura 28.11 Estrutura da helicase. Estrutura da helicase hexamérica do bacteriófago T7. Uma das seis unidades é mostrada em amarelo com a NTPase de alça P mostrada em violeta. As alças que participam na ligação do DNA são ressaltadas pelo oval amarelo. *Observe* que cada subunidade interage estreitamente com suas vizinhas e que as alças de ligação de DNA revestem a cavidade no centro da estrutura. [Desenhada a partir de 1E0K.pdb.]

A separação das fitas de DNA exige helicases específicas e hidrólise do ATP

Para que ocorra replicação de uma molécula de DNA de fita dupla, as duas fitas da dupla-hélice precisam ser separadas uma da outra, pelo menos localmente. Essa separação faz com que cada fita possa atuar como molde a partir do qual pode ser montada uma nova cadeia polinucleotídica. Enzimas específicas, denominadas *helicases*, utilizam a energia da hidrólise do ATP para acionar a separação das fitas.

As helicases constituem uma grande família diversificada de enzimas que atuam em numerosos processos biológicos. As helicases na replicação do DNA são tipicamente oligômeros contendo seis subunidades que formam uma estrutura em anel. A estrutura de uma dessas helicases, a do bacteriófago T7, foi determinada e muito ajudou a esclarecer o mecanismo dessas enzimas (Figura 28.11). Cada uma das subunidades nessa estrutura hexamérica apresenta uma estrutura central que inclui um domínio de NTPase com alça P (ver Figura 9.51). Além da alça P, cada subunidade tem duas alças que se estendem para o centro da estrutura em anel e que interagem com o DNA. Cada subunidade interage estreitamente com suas duas vizinhas na estrutura em anel. Um exame mais detalhado dessa estrutura revela que o anel desvia-se significativamente da simetria de seis unidades. Esse desvio é ainda mais aparente quando o análogo de ATP não hidrolisável, o AMP-PNP, é acrescentado em estudos laboratoriais da estrutura da helicase.



AMP-PNP

O AMP-PNP liga-se a apenas quatro das seis subunidades dentro do anel (Figura 28.12). Além disso, os quatro sítios de ligação de nucleotídios não são idênticos e são divididos em duas classes. Uma classe parece estar bem posicionada para ligar-se ao ATP, porém não catalisa a sua hidrólise, enquanto a outra classe é mais apropriada para catalisar a hidrólise, porém não libera os produtos dessa hidrólise. As classes são análogas às duas conformações diferentes da miosina – uma para a ligação do ATP e outra para hidrolisá-lo (Seção 9.4). Por fim, as seis subunidades são divididas em três classes no que concerne à sua orientação em relação à estrutura global do anel, com diferenças na rotação ao redor de um eixo no plano do anel de aproximadamente 30°. Essas diferenças de orientação afetam a posição das duas alças de ligação do DNA em cada subunidade.

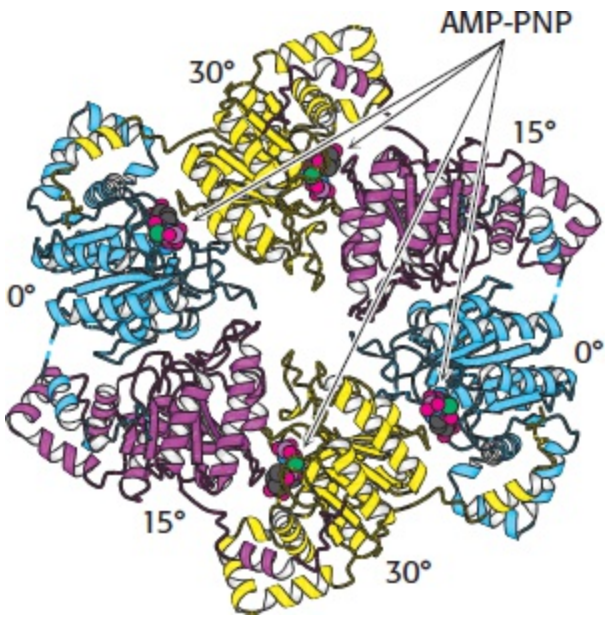


Figura 28.12 Assimetria da helicase. A estrutura dos complexos da T7 helicase com o análogo do ATP, AMP-PNP é mostrada. As três classes de subunidades da helicase estão indicadas em azul, vermelho e amarelo. A rotação em relação ao plano do hexâmero é mostrada para cada subunidade. *Observe* que apenas quatro das subunidades, aquelas mostradas em azul e amarelo, ligam-se ao AMP-PNP. [Desenhada a partir de 1E0K.pdb.]

Essas observações são compatíveis com o seguinte mecanismo para a helicase (Figura 28.13). Somente uma única fita de DNA pode se ajustar pelo centro do anel. Essa fita simples liga-se a alças em duas subunidades adjacentes, uma das quais está ligada ao ATP, enquanto a outra está ligada a ADP + P_i. A ligação do ATP aos domínios que inicialmente não tinham nenhum nucleotídio ligado leva a mudança conformacional em todo o hexâmero, com consequente liberação de ADP + P_i das duas subunidades e ligação do DNA de fita simples por um dos domínios que acabou de se ligar ao ATP. Essa mudança conformacional traciona o DNA através do centro do hexâmero. A proteína atua

como cunha, afastando as duas fitas da dupla-hélice. Em seguida, esse ciclo se repete, movendo duas bases ao longo da fita de DNA a cada ciclo.

28.2 O desenrolamento e o superespiralamento do DNA são controlados por topoisomerases

À medida que a helicase se move desenrolando o DNA, o DNA em frente da helicase torna-se superenrolado na ausência de outras alterações. Conforme discutido no Capítulo 4, as duplas-hélices do DNA que estão sob tensão torcional tendem a dobrar-se sobre si mesmas, formando estruturas terciárias criadas pelo *superespiralamento*. Consideraremos inicialmente o superespiralamento do DNA em termos quantitativos e, em seguida, focalizaremos as topoisomerases, enzimas que podem modular diretamente o enrolamento e o superespiralamento do DNA. O superespiralamento é mais facilmente compreendido se considerarmos moléculas circulares de DNA; todavia, ele também se aplica a moléculas lineares de DNA retidas em alças por outros meios. As moléculas de DNA dentro das células estão, em sua maioria, sujeitas ao superespiralamento.

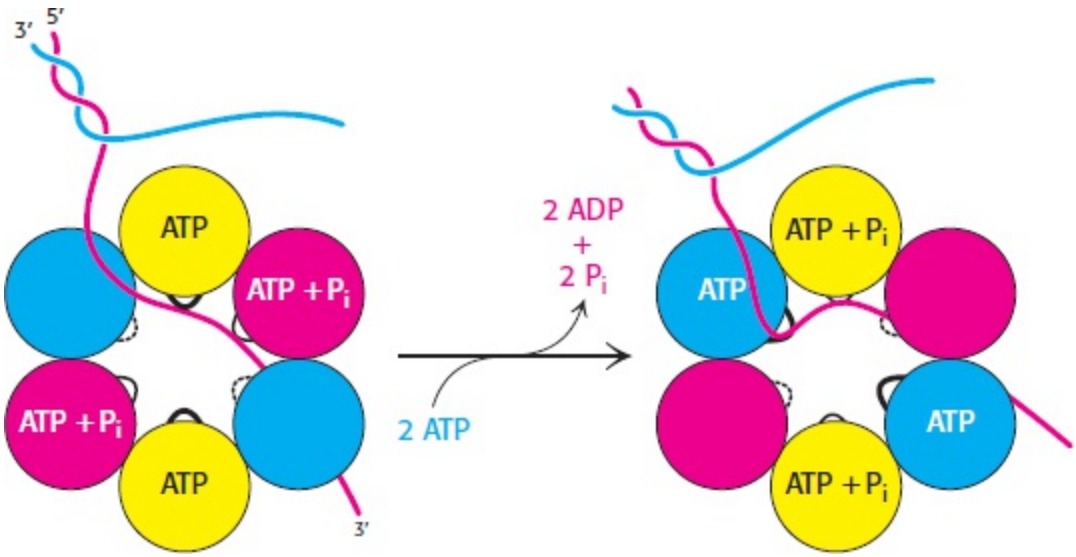


Figura 28.13 Mecanismo da helicase. Uma das fitas da dupla-hélice passa pelo orifício no centro da helicase, ligada às alças de duas subunidades adjacentes. Duas das subunidades não contêm nucleotídios ligados. Com a ligação do ATP a essas duas subunidades e a liberação de ADP + P_i de duas outras subunidades, o hexâmero da helicase sofre mudança conformacional, tracionando o DNA através da helicase. A helicase atua como cunha para forçar a separação das duas fitas de DNA.

Consideremos um DNA dúplex linear com 260 pb na forma de B-DNA (Figura 28.14A). Como o número de pares de bases por giro em uma molécula de DNA sem tensão é, em média, de 10,4, essa molécula linear de DNA apresenta 25 (260/10,4) giros. As extremidades dessa hélice podem ser unidas para produzir um DNA circular *relaxado* (Figura 28.14B). Um DNA circular diferente pode ser formado pelo desenrolamento do dúplex linear por dois giros antes de unir suas extremidades (Figura 28.14C). Qual a consequência estrutural do desenrolamento antes da ligação? São possíveis duas conformações limitantes. O DNA pode dobrar-se em uma estrutura contendo 23 giros de hélice B e uma alça desenrolada (Figura 28.14D). De modo alternativo, a dupla-hélice pode dobrar sobre si mesma. Esses cruzamentos são denominados *superespirais*. Em particular, pode haver formação de uma estrutura superespiralada com 25 giros de hélice B e 2 giros de super-hélice para a direita

(denominada *negativa*) (Figura 28.14E).

O superespiralamento altera acentuadamente a forma global do DNA. *Uma molécula de DNA superespiralada é mais compacta do que uma molécula relaxada de DNA do mesmo comprimento*. Por conseguinte, o DNA superespiralado move-se mais rapidamente do que o DNA relaxado quando analisado por centrifugação ou eletroforese. O desenrolamento causará superespiralamento nas moléculas circulares de DNA, estejam elas fechadas de modo covalente ou presas em configurações fechadas por outros meios.

O número de ligação do DNA, uma propriedade topológica, determina o grau de superespiralamento

Podemos compreender melhor a conformação do DNA por meio de conceitos obtidos da topologia, um ramo da matemática que trata das propriedades estruturais que são inalteradas por deformações, como estiramento e dobramento. Uma propriedade topológica essencial de uma molécula de DNA circular é o seu *número de ligação (Lk)*, que é igual ao número de vezes que uma fita de DNA gira para a direita ao redor do eixo da hélice, quando o eixo está situado em um plano, como na Figura 28.14A. Para o DNA relaxado mostrado na Figura 28.14B, $Lk = 25$. Para a molécula parcialmente desenrolada mostrada na parte D e para a molécula superespiralada mostrada na parte E, $Lk = 23$, visto que o dúplex linear foi desenrolado em dois giros completos antes do fechamento. As moléculas que diferem apenas no número de ligação são *isômeros topológicos* ou *topoisômeros* uma da outra. *Os topoisômeros de DNA só podem ser interconvertidos cortando uma ou ambas as fitas de DNA e, em seguida, reunindo-as*.

O DNA desenrolado e o DNA superespiralado mostrados na Figura 28.14D e E são topologicamente idênticos, porém geometricamente diferentes. Eles apresentam o mesmo valor de *Lk*, porém diferem na *torção* (*Tw*, do inglês *twist*) e na *contorção* (*Wr*, do inglês *writhe*). Embora as definições rigorosas de torção e contorção sejam complexas, a torção é uma medida do enrolamento helicoidal das fitas de DNA uma ao redor da outra, enquanto a contorção é uma medida do espiralamento do eixo da dupla-hélice – isto é, superespiralamento. Uma espiral para a direita recebe um número negativo (superespiralamento negativo), enquanto uma espiral para a esquerda recebe um número positivo (superespiralamento positivo).

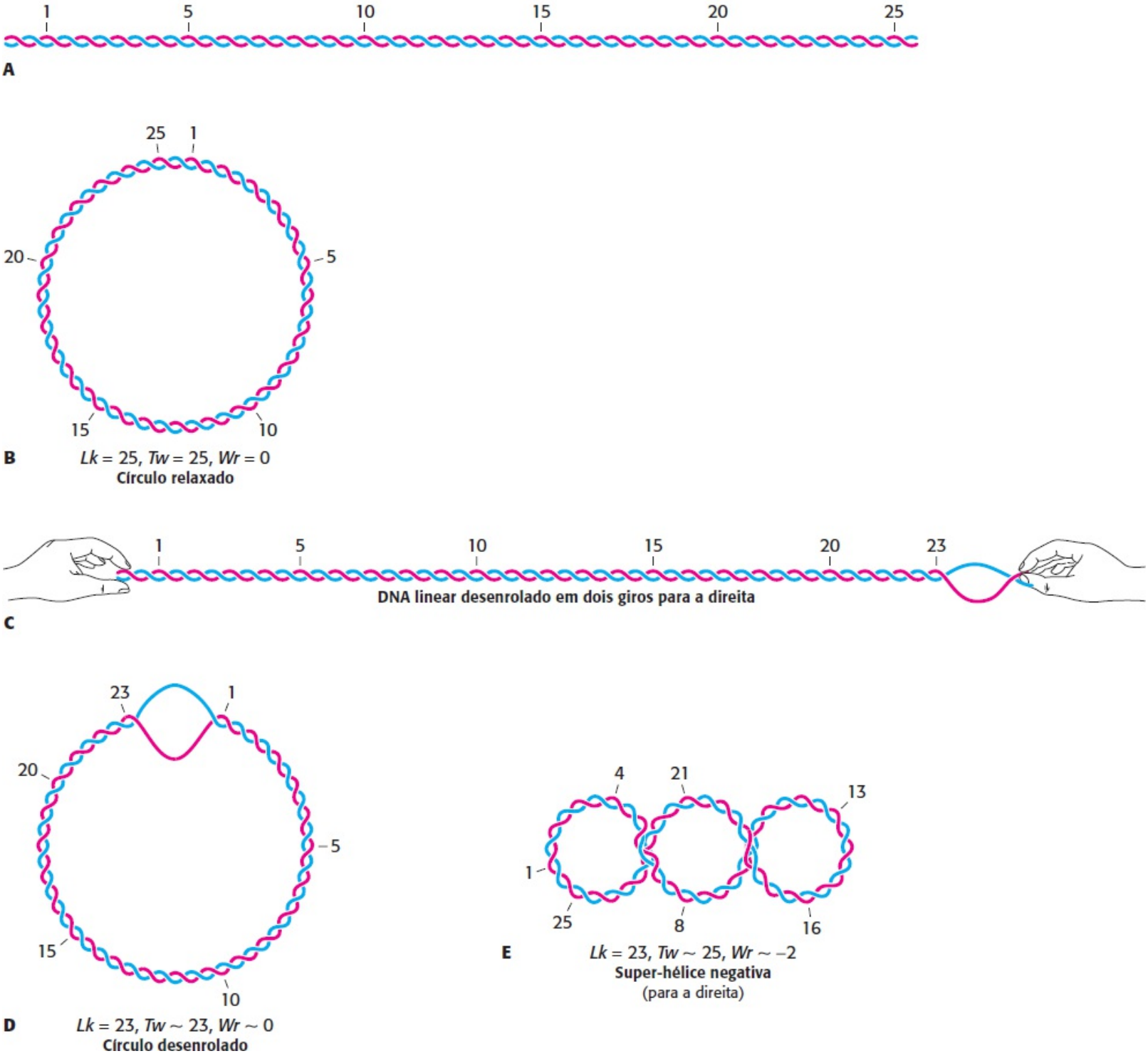


Figura 28.14 Número de ligação. As relações entre o número de ligação (*Lk*), o número de torção (*Tw*) e o número de contorção (*Wr*) de uma molécula circular de DNA reveladas esquematicamente. [De W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure* (Springer Verlag, 1984), p. 452.]

Existe uma relação entre *Tw* e *Wr*? De fato, ela existe. A topologia nos diz que a soma de *Tw* e *Wr* é igual a *Lk*.

$$Lk = Tw + Wr$$

Na Figura 28.14, o DNA circular parcialmente desenrolado tem um *Tw* cerca de 23, o que significa que a hélice tem 23 giros, e *Wr* cerca de 0, o que significa que a hélice não se cruzou para criar uma superespiral. Entretanto, o DNA superespiralado tem um *Tw* cerca de 25 e uma *Wr* cerca de –2. Essas

formas podem ser interconvertidas sem clivar a cadeia de DNA, visto que elas apresentam o mesmo valor de *Lk* – isto é, 23. A divisão do *Lk* (que precisa ser um número inteiro) entre *Tw* e *Wr* (que não precisam ser números inteiros) é determinada pela energética. A energia livre é minimizada quando cerca de 70% da mudança no *Lk* são expressos em *Wr* e 30%, em *Tw*. Por conseguinte, a forma mais estável seria uma com *Tw* = 24,4 e *Wr* = –1,4. Assim, *uma redução do* Lk *provoca tanto um superespiralamento para a direita (negativo) do eixo do DNA quanto o desenrolamento do dúplex*. Os topoisômeros que diferem em apenas 1 no *Lk* e, em consequência, por 0,7 na *Wr*, podem ser prontamente separados por eletroforese em gel de agarose, visto que seus volumes hidrodinâmicos são muito diferentes; o *superespiralamento condensa o DNA* (Figura 28.15).

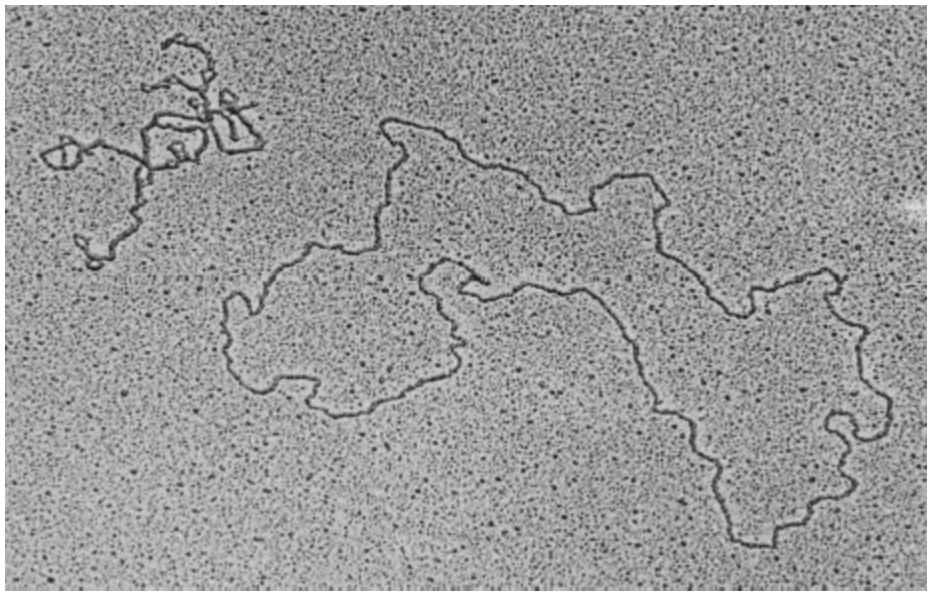


Figura 28.15 Topoisômeros. Micrografia eletrônica mostrando o DNA negativamente superespiralado e relaxado. [Cortesia do Dr. Jack Griffith.]

As topoisomerases preparam a dupla-hélice para o desenrolamento

As moléculas de DNA de ocorrência natural são, em sua maioria, negativamente superespiraladas. Qual a base dessa prevalência? Conforme já assinalado, o superespiralamento negativo surge do desenrolamento ou desenrolamento parcial do DNA. Em essência, o superespiralamento negativo prepara o DNA para processos que exigem a separação das fitas de DNA, como a replicação. O superespiralamento positivo condensa o DNA de modo efetivo, porém torna mais difícil a separação das fitas.

A presença de superespirais na área imediata ao desenrolamento dificultaria esse desenrolamento. Por conseguinte, as superespirais negativas precisam ser continuamente removidas, e o DNA precisa ser relaxado, à medida que a dupla-hélice se desenrola. James Wang e Martin Gellert descobriram enzimas específicas, denominadas *topoisomerases*, que introduzem ou eliminam as superespirais. As *topoisomerases tipo I* catalisam o relaxamento do DNA superespiralado, um processo termodinamicamente favorável. As *topoisomerases tipo II* utilizam a energia livre da hidrólise do ATP para acrescentar superespirais negativas ao DNA. As topoisomerases tanto do tipo I quanto do tipo II desempenham papéis importantes na replicação do DNA, bem como na transcrição e na recombinação.

Essas enzimas alteram o número de ligação do DNA ao catalisarem um processo em três etapas:

(1) a *clivagem* de uma ou de ambas as fitas do DNA, (2) a *passagem* de um segmento do DNA por essa quebra, e (3) a *ressoldagem* da quebra do DNA. As topoisomerases tipo I clivam apenas uma fita do DNA, enquanto as enzimas tipo II clivam ambas as fitas. Os dois tipos de enzimas exibem várias características em comum, incluindo o uso de resíduos essenciais de tirosina para formar ligações covalentes no arcabouço polinucleotídico que é transitoriamente quebrado.

As topoisomerases tipo I relaxam estruturas superespiraladas

As estruturas tridimensionais de várias topoisomerases tipo I já foram determinadas (Figura 28.16). Essas estruturas revelam muitas características do mecanismo de reação.

A topoisomerase tipo I humana compreende quatro domínios, que estão dispostos ao redor de uma cavidade central com diâmetro de 20 Å, o tamanho exatamente correto para acomodar uma molécula de DNA de fita dupla. Essa cavidade também inclui um resíduo de tirosina (Tyr 723), que atua como nucleófilo para clivar o arcabouço do DNA durante a catálise.

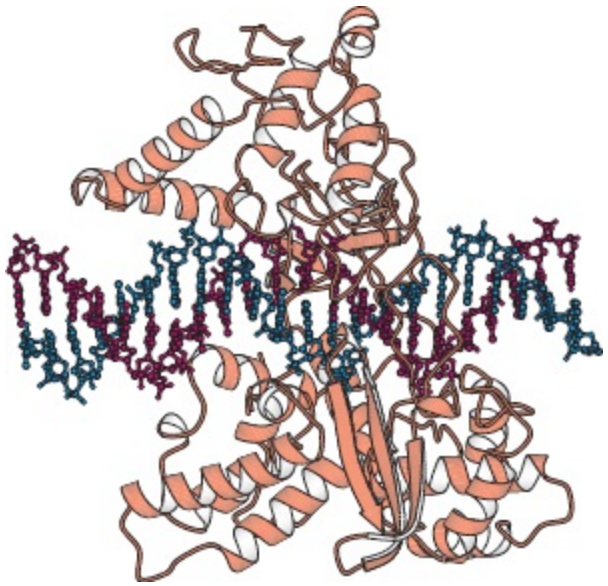


Figura 28.16 Estrutura da topoisomerase I. A figura mostra a estrutura de um complexo entre um fragmento da topoisomerase I humana e o DNA. *Observe* que o DNA está situado em uma cavidade central dentro da enzima. [Desenhada a partir de 1EJ9.pdb.]

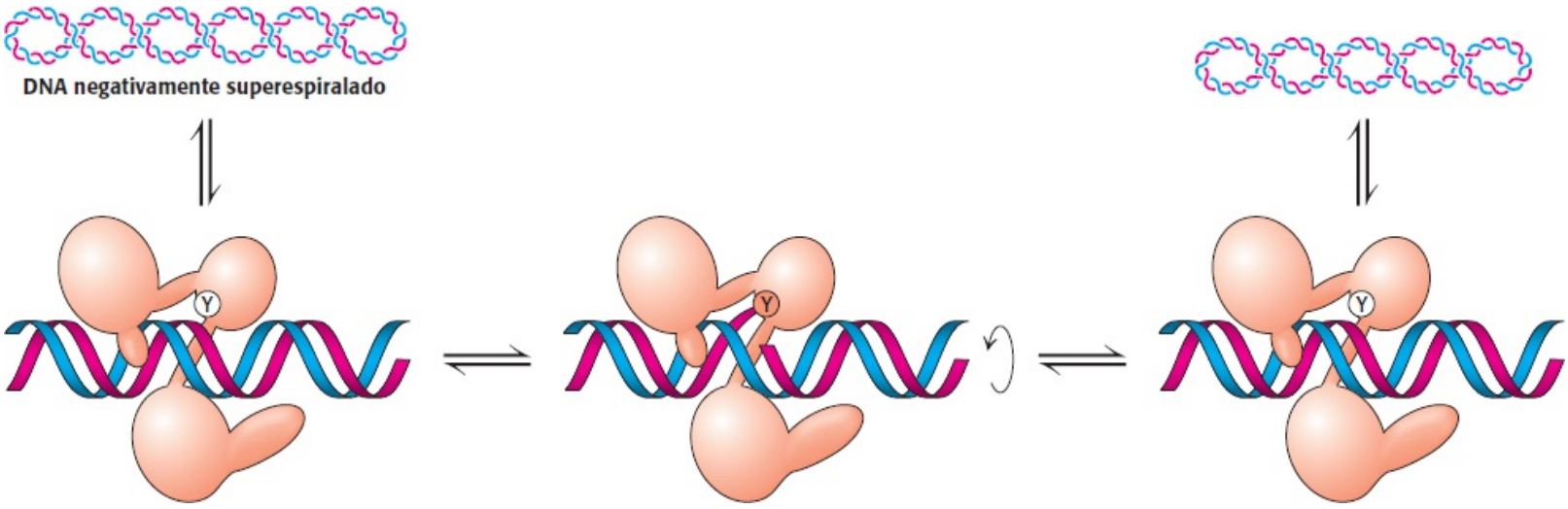
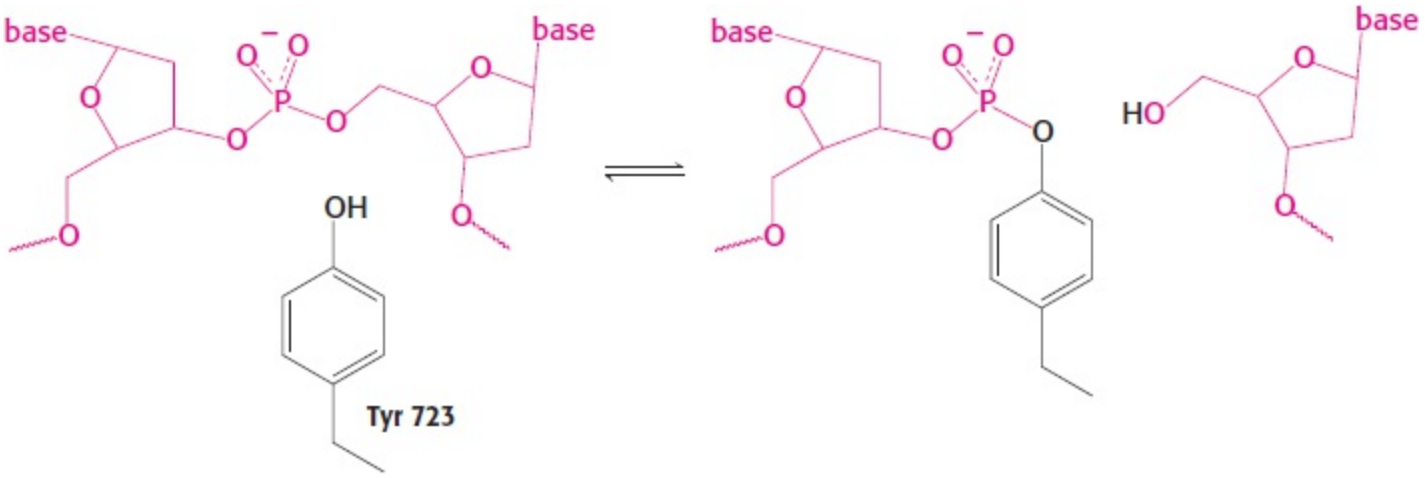


Figura 28.17 Mecanismo da topoisomerase I. Com sua ligação ao DNA, a topoisomerase I cliva uma fita do DNA por meio de um resíduo de tirosina (Y), atacando um grupo fosforila. Uma vez clivada, a fita sofre rotação de modo controlado

ao redor da outra fita. A reação é completada pela religação da fita clivada. Esse processo resulta em relaxamento parcial ou completo de um plasmídio superespiralado.

Com base em análises dessas estruturas e nos resultados de outros estudos, sabe-se que o relaxamento de moléculas de DNA negativamente superespiraladas ocorre da seguinte maneira (Figura 28.17). Em primeiro lugar, a molécula de DNA liga-se dentro da cavidade da topoisomerase. O grupo hidroxila da tirosina 723 ataca um grupo fosforila em uma fita do arcabouço de DNA, formando uma ligação fosfodiéster entre a enzima e o DNA, clivando o DNA e liberando um grupo hidroxila 5′ livre.



Com a clivagem do arcabouço de uma fita, o DNA pode agora sofrer rotação ao redor da fita remanescente, e seu movimento é acionado pela liberação da energia armazenada devido ao superespiralamento. A rotação do DNA desenrola as superespirais. A enzima controla a rotação, de modo que o desenrolamento não seja rápido. O grupo hidroxila livre do DNA ataca o resíduo de fosfotirosina, ressoldando o arcabouço e liberando a tirosina. Em seguida, o DNA é liberado para se dissociar da enzima. Por conseguinte, a clivagem reversível de uma fita do DNA superespiralado possibilita o relaxamento parcial das superespirais pela rotação controlada.

As topoisomerases tipo II podem introduzir superespirais negativas por meio de acoplamento à hidrólise do ATP

O superespiralamento exige um aporte de energia, visto que uma molécula superespiralada, diferentemente da molécula correspondente relaxada, sofre tensão devido à torção. A introdução de uma superespiral adicional em um plasmídio de 3.000 pb tipicamente requer cerca de 30 kJ mol^{-1} (7 kcal mol^{-1}).

O superespiralamento pode ser catalisado por topoisomerases tipo II. Essas elegantes máquinas moleculares acoplam a ligação e a hidrólise do ATP à passagem direcionada de uma dupla-hélice de DNA pela outra dupla-hélice de DNA temporariamente clivada. Essas enzimas apresentam várias características de mecanismo em comum com as topoisomerases tipo I.

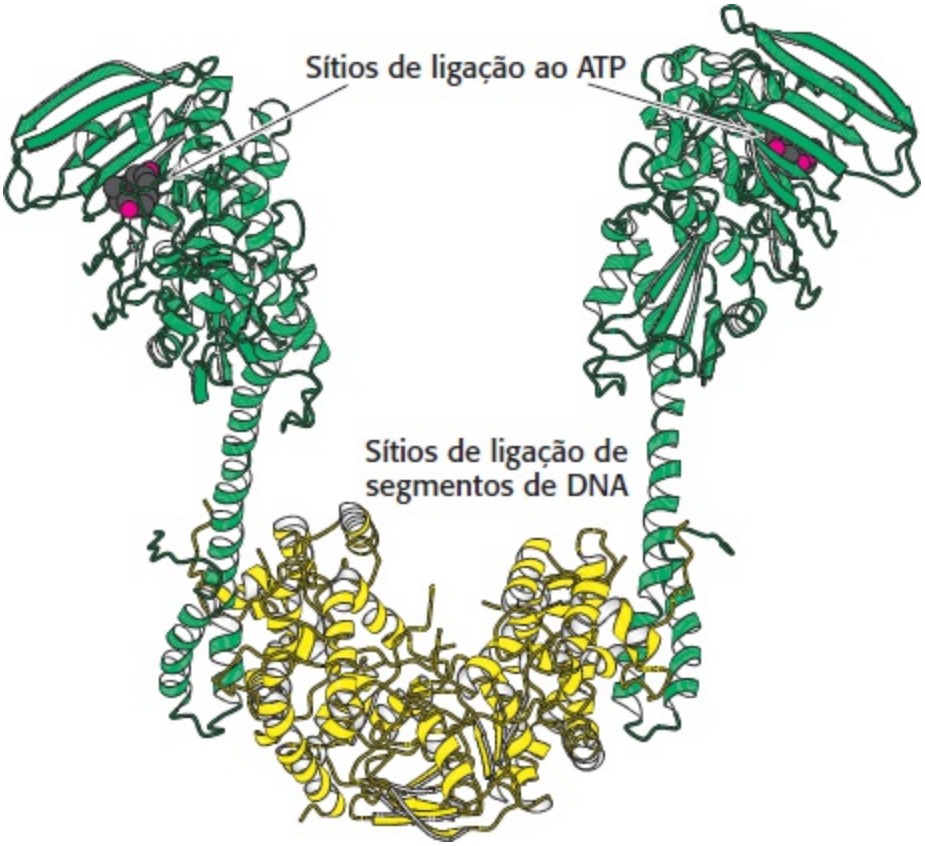


Figura 28.18 Estrutura da topoisomerase II. A estrutura dimérica de uma topoisomerase II típica, a do archaeon *Sulfolobus shibatae*. *Observe* que cada metade da enzima apresenta um domínio (mostrado em amarelo) que contém uma região para ligação de uma dupla-hélice de DNA e outro domínio (mostrado em verde) que contém sítios de ligação ao ATP. [Desenhada a partir de 2ZBK.pdb.]

As moléculas de topoisomerase II são diméricas, com uma cavidade grande interna (Figura 28.18). A cavidade grande tem comportas tanto na parte superior quanto na base, que são cruciais para a ação da topoisomerase. A reação começa com a ligação de uma dupla-hélice (daqui em diante designada como segmento G [do inglês *gate*, "portão"]) à enzima (Figura 28.19). Cada fita é posicionada próximo a um resíduo de tirosina, uma de cada monômero, capaz de formar uma ligação covalente com o arcabouço de DNA. Em seguida, esse complexo liga-se frouxamente a uma segunda dupla-hélice de DNA (daqui em diante designada como segmento T, de transportado). Cada monômero da enzima apresenta um domínio que se liga ao ATP; essa ligação ao ATP leva a uma mudança conformacional, que favorece fortemente a junção dos dois domínios. À medida que esses domínios se aproximam um do outro, eles retêm o segmento T ligado. Essa mudança conformacional também força a separação e a clivagem das duas fitas do segmento G. Cada fita está ligada à enzima por uma ligação de tirosina-fosfodiéster. Diferentemente das enzimas tipo I, as topoisomerases tipo II mantêm firmemente o DNA de modo que ele não possa rotar. Em seguida, o segmento T passa através do segmento G clivado e para dentro da grande cavidade central. A ligação do segmento G leva à liberação do segmento T pelo "portão" na parte inferior da enzima. A hidrólise do ATP e a liberação de ADP e de ortofosfato possibilitam a separação dos domínios de ligação de ATP, preparando a enzima para a sua ligação a outro segmento T. O processo global leva a uma diminuição do número de ligação em dois.

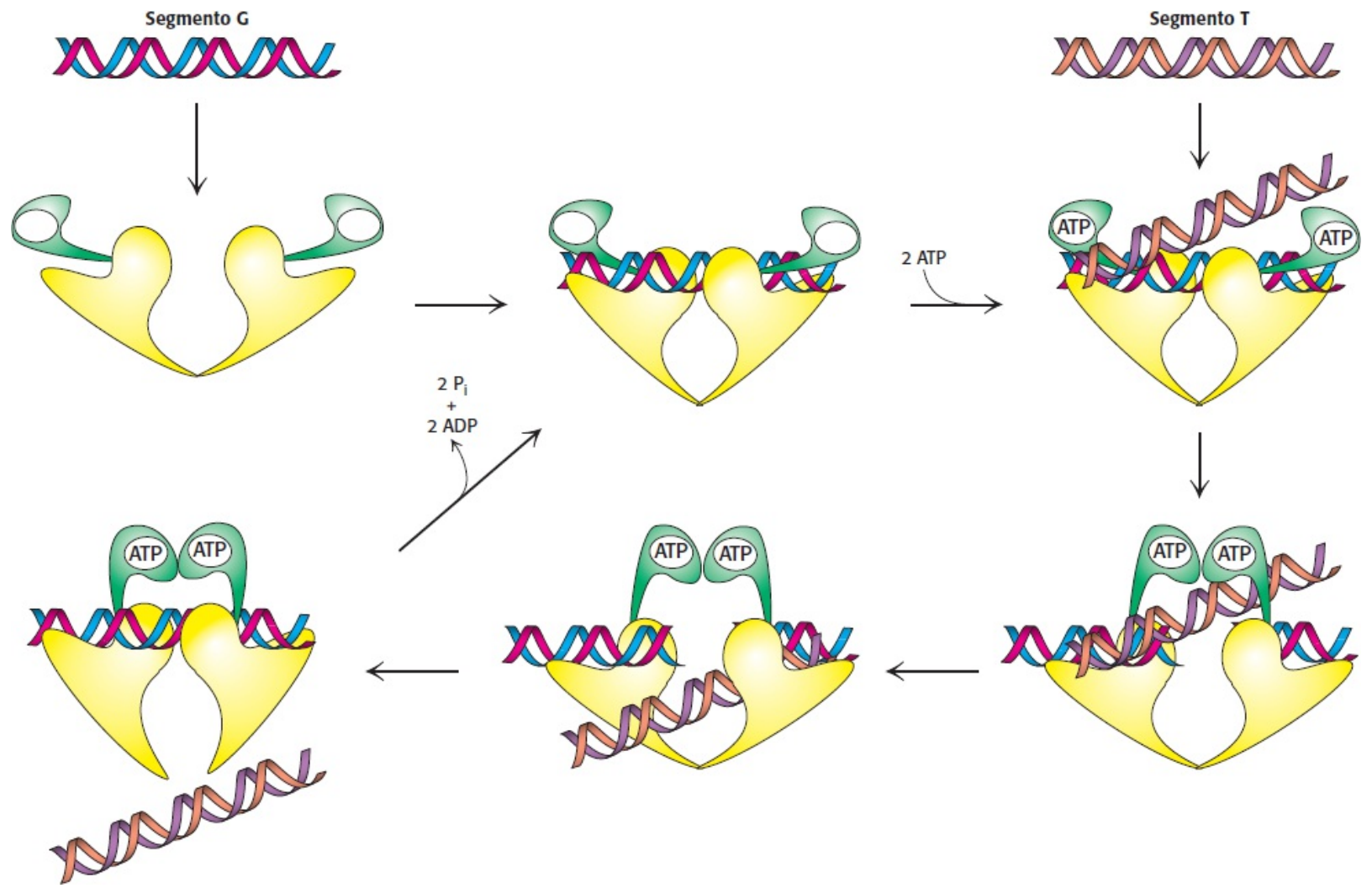
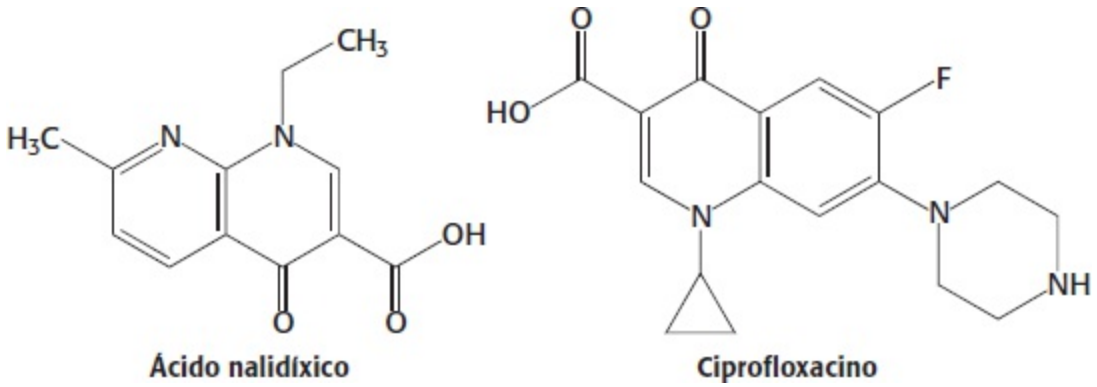


Figura 28.19 Mecanismo da topoisomerase II. A topoisomerase II liga-se inicialmente a um DNA dúplex, denominado segmento G (*do inglês gate*, "portão"). A ligação do ATP aos dois domínios N-terminais reúne esses dois domínios. Essa mudança conformacional leva à clivagem de ambas as fitas do segmento G e à ligação de um DNA dúplex adicional, o segmento T. Em seguida, esse segmento T move-se através da quebra no segmento G e para fora da parte inferior da enzima. A hidrólise do ATP restabelece a enzima com o segmento G ainda ligado.

A topoisomerase II bacteriana (frequentemente denominada DNA girase) constitui o alvo de diversos antibióticos que inibem a enzima procariótica muito mais do que a eucariótica. A *novobiocina* bloqueia a ligação do ATP à girase. O *ácido nalidíxico* e o *ciprofloxacino*, por outro lado, interferem na ruptura e reunião das cadeias de DNA. Esses dois inibidores de girase são amplamente utilizados no tratamento de infecções do trato urinário e outras infecções, incluindo aquelas causadas pelo *Bacillus anthracis* (antraz). A *camptotecina*, um agente antitumoral, inibe a topoisomerase I humana ao estabilizar a forma da enzima ligada covalentemente ao DNA.



28.3 A replicação do DNA é altamente coordenada

A replicação do DNA precisa ser muito rápida, tendo em vista os tamanhos dos genomas e a velocidade da divisão celular. O genoma de *E. coli* contém 4,6 milhões de pares de bases e é copiado em menos de 40 min. Por conseguinte, são incorporadas 2.000 bases por segundo. As atividades enzimáticas precisam ser altamente coordenadas para replicar genomas inteiros de modo preciso e rapidamente.

Iniciaremos nosso estudo da coordenação da replicação do DNA observando a *E. coli*, que foi amplamente estudada. Para esse microrganismo com genoma relativamente pequeno, a replicação começa em um único sítio e prossegue o redor do cromossomo circular. A coordenação da replicação do DNA eucariótico é mais complexa, visto que existem numerosos sítios de iniciação em todo o genoma, e é necessária uma enzima adicional para replicar as extremidades de cromossomos lineares.

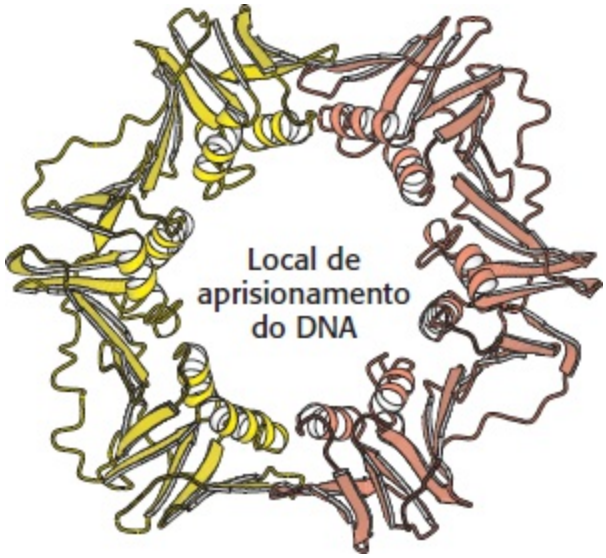


Figura 28.20 Estrutura de um grampo de DNA de deslizamento. A subunidade β dimérica da DNA polimerase III forma um anel que circunda o DNA dúplex. *Observe* a cavidade central pela qual desliza o molde de DNA. Ao prender a molécula de DNA no anel, a enzima polimerase é capaz de se mover sem sair do substrato de DNA. [Desenhada a partir de 2POL.pdb.]

A replicação do DNA necessita de polimerases altamente processivas

As polimerases de replicação caracterizam-se pela sua alta *potência catalítica, fidelidade e processividade*. A *processividade* refere-se à capacidade de uma enzima de catalisar muitas reações consecutivas sem liberar o seu substrato. Essas polimerases consistem em montagens de muitas subunidades que evoluíram para se unir a seus moldes e não deixá-los até que muitos nucleotídios tenham sido adicionados. A fonte da processividade foi revelada pela determinação da estrutura tridimensional da subunidade β_2 da polimerase de replicação de *E. coli*, denominada DNA polimerase III (Figura 28.20). Essa unidade mantém a polimerase associada à dupla-hélice do DNA. Ela tem a forma de um anel em estrela. Um orifício de 35 Å de diâmetro em seu centro pode acomodar prontamente uma molécula de DNA dúplex, deixando, entretanto, um espaço suficiente entre o DNA e a proteína para possibilitar o rápido deslizamento durante a replicação. Para obter uma velocidade catalítica de 1.000 nucleotídios polimerizados por segundo, é necessário que 100

voltas do DNA dúplex (um comprimento de 3.400 Å ou 0,34 mm) deslizem pelo orifício central de β_2 por segundo. Por conseguinte, *β_2 desempenha um papel essencial na replicação, servindo como grampo de deslizamento do DNA.*

Como o DNA torna-se aprisionado dentro do grampo de deslizamento? As polimerases de replicação também incluem montagens de subunidades que funcionam como *aplicadores de grampos*. Essas enzimas seguram o grampo de deslizamento e, utilizando a energia da ligação do ATP, separam uma das interfaces entre as duas subunidades do grampo de deslizamento. O DNA pode mover-se pela lacuna, inserindo-se pelo orifício central. Em seguida, a hidrólise do ATP libera o grampo, que se fecha ao redor do DNA.

Enzima processiva

Do latim *procedere*, "ir adiante".

Uma enzima que catalisa múltiplos ciclos de alongamento ou digestão de um polímero, enquanto o polímero permanece ligado. Em contrapartida, uma *enzima distributiva* libera o seu substrato polimérico entre etapas catalíticas sucessivas.

As fitas condutora e defasada são sintetizadas de modo coordenado

As polimerases de replicação, como a DNA polimerase III, sintetizam as fitas condutora e defasada simultaneamente na forquilha de replicação (Figura 28.21). A DNA polimerase III começa a síntese da fita condutora a partir do RNA iniciador (*primer*) formado pela primase. O DNA dúplex à frente da polimerase é desenrolado por uma helicase hexamérica, denominada DnaB. Cópias da proteína de ligação de fita simples (SSB, do inglês *single-stranded-binding protein*) ligam-se às fitas desenroladas, mantendo-as separadas, de modo que ambas possam servir como moldes. A fita condutora é sintetizada continuamente pela polimerase III. Concomitantemente, a topoisomerase II introduz superespirais com giro para a direita (negativas) para evitar um problema topológico.

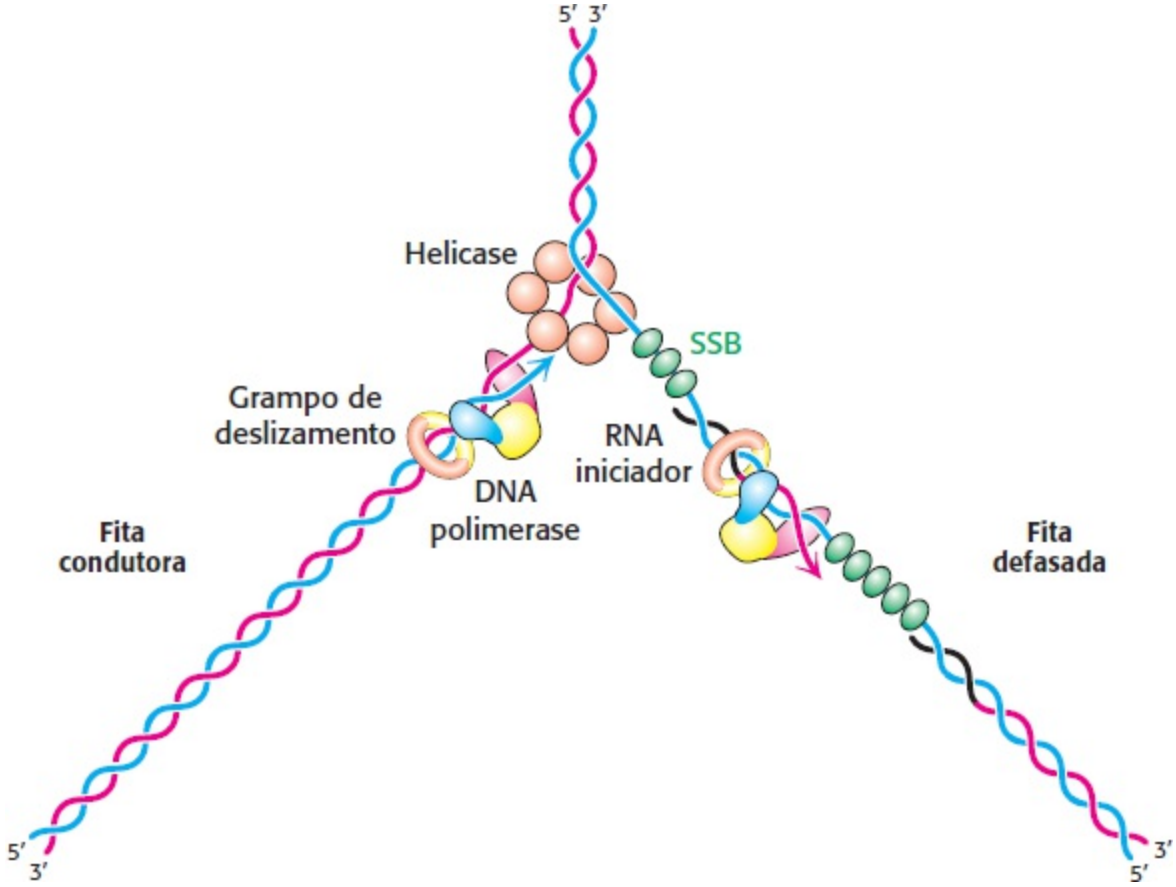


Figura 28.21 Forquilha de replicação. Vista esquemática do arranjo da DNA polimerase III e enzimas e proteínas associadas presentes na replicação do DNA. A helicase separa as duas fitas da dupla-hélice parental, permitindo que as DNA polimerases utilizem cada fita como molde para a síntese de DNA. SSB, proteína de ligação de fita simples.

O modo de síntese da fita defasada é necessariamente mais complexo. Conforme já assinalado, a fita defasada é sintetizada em fragmentos, de modo que a polimerização 5′ → 3′ leva a um crescimento global no sentido 3′ → 5′. Contudo, a síntese da fita defasada é coordenada com a síntese da fita condutora. Como essa coordenação é efetuada? O exame da composição das subunidades da holoenzima da DNA polimerase III revela uma solução elegante (Figura 28.22). A holoenzima inclui duas cópias do cerne da enzima polimerase, que é constituída pela própria DNA polimerase (a subunidade α); a subunidade ε, uma exonuclease de revisão 3′ para 5′; outra subunidade, denominada θ; e duas cópias da subunidade β dimérica do grampo de deslizamento. Os cernes das enzimas estão ligados a uma estrutura central com a composição de subunidades $\gamma\tau_2\delta\delta'\chi\varphi$. O complexo $\gamma\tau_2\delta\delta'$ é o aplicador do grampo, e as subunidades χ e φ interagem com a proteína de ligação do DNA de fita simples. Todo o aparelho interage com a helicase hexamérica DnaB. As polimerases eucarióticas de replicação apresentam composições e estruturas de subunidades semelhantes, porém ligeiramente mais complicadas.

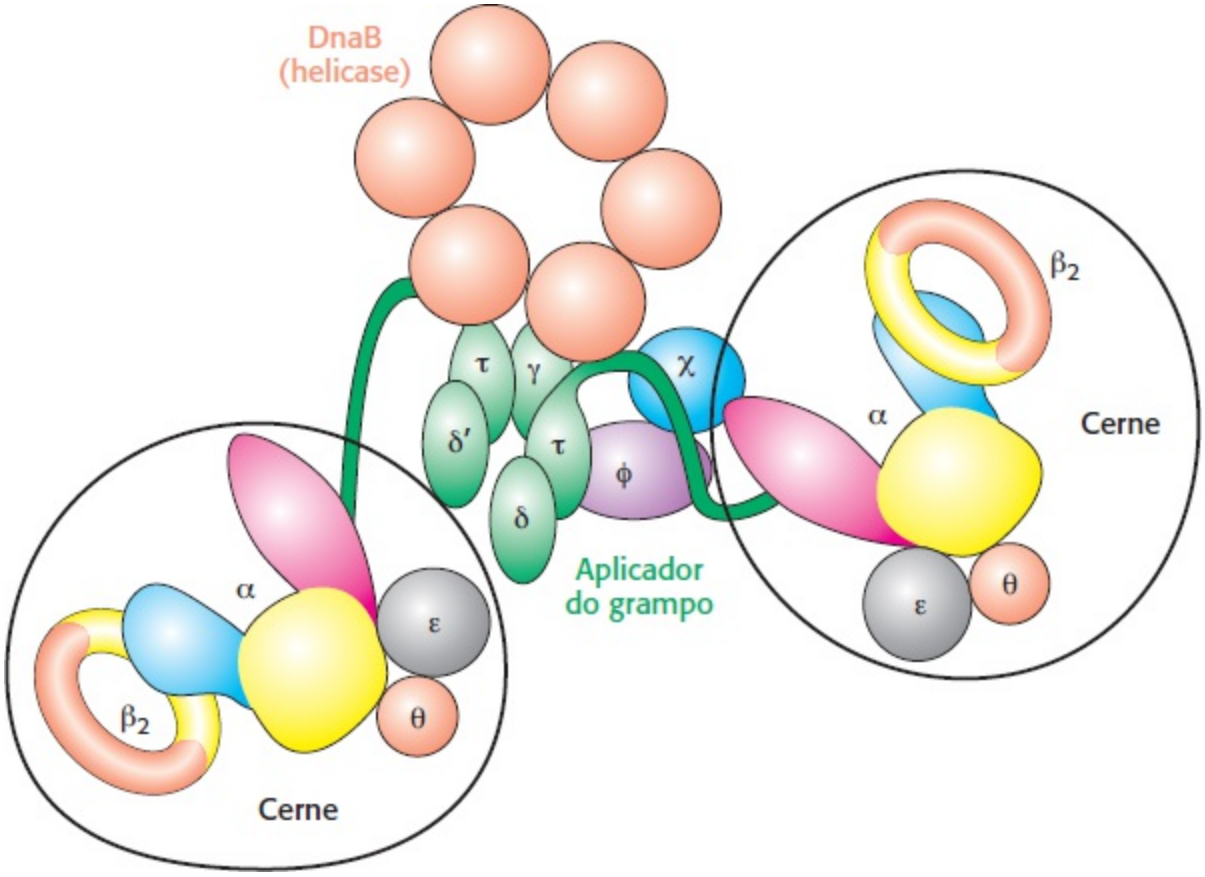


Figura 28.22 Holoenzima da DNA polimerase. Cada holoenzima consiste em duas cópias do cerne da enzima polimerase, que compreende as subunidades α, ε e θ, e duas cópias da subunidade β, ligadas a uma estrutura central. A estrutura central inclui o complexo aplicador do grampo e a helicase hexamérica DnaB.

O molde da fita defasada faz uma alça, de modo que ele passa pelo sítio da polimerase em uma subunidade de uma polimerase III dimérica, no mesmo sentido que o molde da fita condutora na outra subunidade, 5′ → 3′. A DNA polimerase III libera o molde da fita defasada após adicionar cerca de 1.000 nucleotídios, liberando o grampo de deslizamento. Em seguida, forma-se uma nova alça, um grampo de deslizamento é adicionado, e a primase mais uma vez sintetiza um segmento curto de RNA iniciador para iniciar a formação de outro fragmento de Okazaki. Esse modo de replicação foi denominado *modelo em trombone*, visto que o tamanho da alça aumenta e diminui como a vara de um trombone (Figura 28.23).

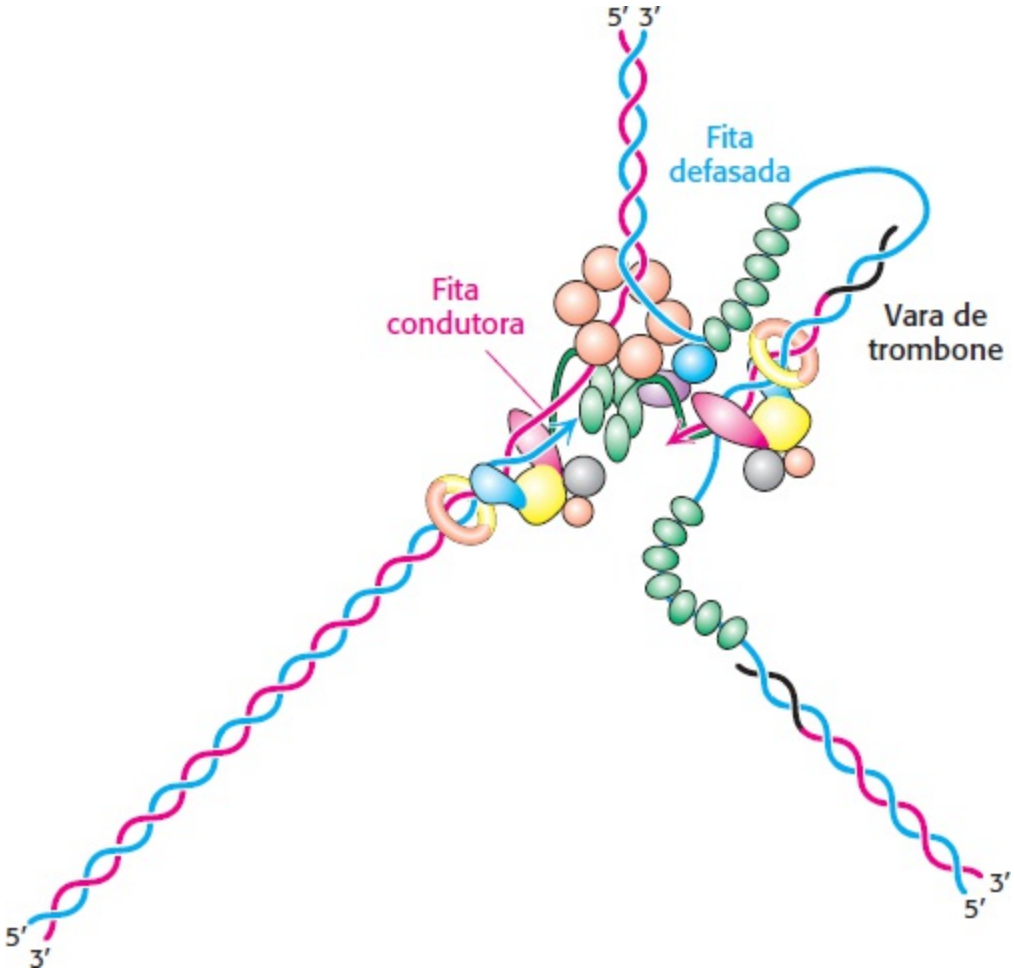


Figura 28.23 Modelo em trombone. A replicação das fitas condutora e defasada é coordenada pela alça da fita defasada, formando uma estrutura que atua como a vara de um trombone, crescendo à medida que a forquilha de replicação se move para frente. Quando a polimerase na fita defasada alcança uma região que foi replicada, o grampo de deslizamento é liberado, e uma nova alça é formada.

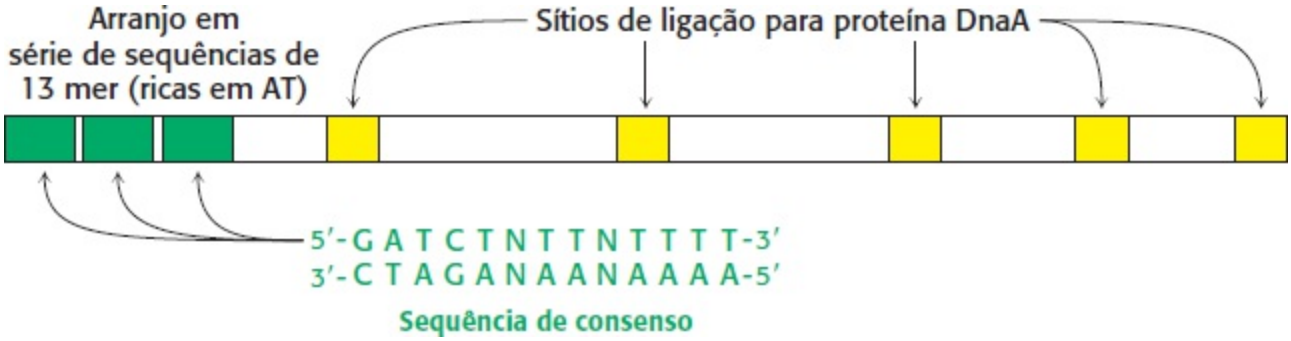


Figura 28.24 Origem da replicação em *E. coli*. O *locus oriC* apresenta um comprimento de 245 pb. Contém um arranjo em sequência de três sequências quase idênticas de 13 nucleotídios (verde) e cinco sítios de ligação (amarelo) para a proteína DnaA.

As lacunas entre os fragmentos da fita defasada nascente são preenchidas pela DNA polimerase I. Essa enzima essencial também utiliza a sua atividade de exonuclease 5′ → 3′ para remover o RNA iniciador situado à frente do sítio da polimerase. O iniciador não pode ser eliminado pela DNA polimerase III, visto que a enzima carece da capacidade de edição 5′ → 3′. Por fim, a DNA ligase conecta os fragmentos.

A replicação do DNA em *Escherichia coli* começa em um sítio único

Em *E. coli*, a replicação do DNA começa em um sítio único dentro do genoma completo de $4{,}6 \times 10^6$ pb. Essa *origem de replicação*, denominada *locus* oriC, é uma região de 245 pb que exibe várias características incomuns (Figura 28.24). O *locus oriC* contém cinco cópias de uma sequência que são sítios de ligação preferidos para a proteína de reconhecimento de origem DnaA. Além disso, o *locus* contém um arranjo em sequências de 13 pb que são ricas em pares de bases AT. São necessárias várias etapas para preparar o início da replicação:

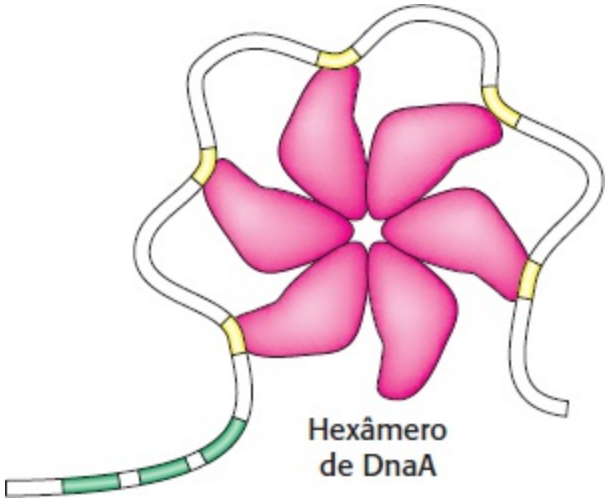


Figura 28.25 Montagem da DnaA. Monômeros de DnaA unem-se a seus sítios de ligação (mostrados em amarelo) em *oriC* e juntam-se para formar uma estrutura complexa, possivelmente o hexâmero cíclico mostrado aqui. Essa estrutura marca a origem da replicação e favorece a separação das fitas de DNA nos sítios ricos em AT (em verde).

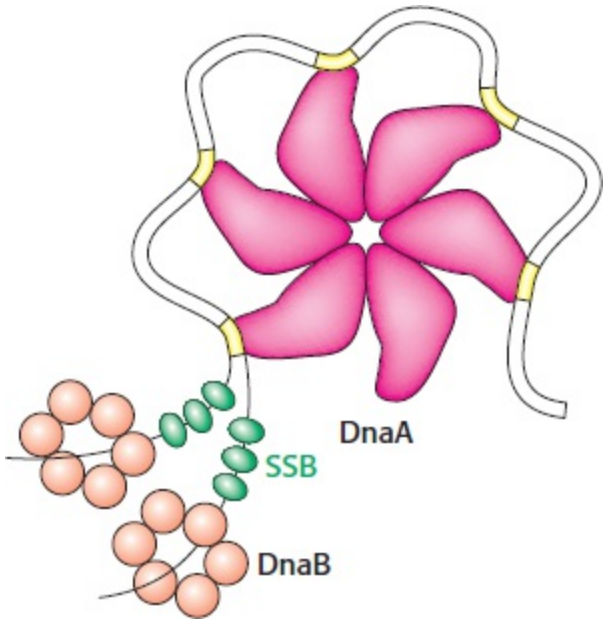


Figura 28.26 complexo pré-iniciador. As regiões ricas em AT são desenroladas e retidas pela proteína de ligação de fita simples (SSB). A DNA helicase hexamérica DnaB é carregada em cada fita. Nesse estágio, o complexo está pronto para a síntese de RNA iniciadores e a montagem da holoenzima DNA polimerase III.

1. *A ligação das proteínas DnaA ao DNA constitui a primeira etapa na preparação para a replicação.* A DnaA é um membro da família NTPase com alça P relacionada com as helicases hexaméricas. Cada monômero de DnaA compreende um domínio de ATPase ligado a um domínio de ligação de DNA em sua extremidade C-terminal. As moléculas de DnaA são capazes de se ligar umas às outras pelos seus domínios de ATPase; um grupo de moléculas de DnaA ligadas irá se separar

com a ligação e a hidrólise do ATP. A ligação de moléculas de DnaA umas às outras sinaliza o início da fase preparatória, e a sua separação sinaliza o término dessa fase. As proteínas DnaA ligam-se aos cinco sítios de alta afinidade em *oriC* e, a seguir, juntam-se com as moléculas de DnaA ligadas a sítios de menor afinidade, formando um oligômero, possivelmente um hexâmero cíclico. O DNA é enrolado ao redor da parte externa do hexâmero de DnaA (Figura 28.25).

2. *As fitas simples de DNA são expostas no complexo pré-iniciador*. Com o DNA enrolado ao redor de um hexâmero de DnaA, proteínas adicionais passam a atuar. A helicase DnaB hexamérica é colocada ao redor do DNA com o auxílio da proteína carregadora de helicase, DnaC. As regiões locais de *oriC*, incluindo as regiões AT, são desenroladas e retidas pela proteína de ligação do DNA de fita simples. O resultado desse processo consiste na produção de uma estrutura denominada *complexo pré-iniciador*, que torna o DNA de fita simples acessível a outras proteínas (Figura 28.26). De modo significativo, a primase, DnaG, é agora capaz de inserir o RNA iniciador.

3. *Montagem da holoenzima da polimerase*. A holoenzima da DNA polimerase III é montada no complexo pré-iniciador, um processo iniciado por interações entre a DnaB e a subunidade do grampo de deslizamento da DNA polimerase III. Essas interações também deflagram a hidrólise do ATP dentro das subunidades de DnaA, assinalando o início da replicação do DNA. A dissolução da montagem de DnaA impede o início de ciclos adicionais de replicação na origem de replicação.

A síntese de DNA nos eucariotos é iniciada em múltiplos sítios

A replicação nos eucariotas assemelha-se mecanicamente à replicação nos procariotos, porém é mais desafiadora por vários motivos. Um deles é o tamanho absoluto: a *E. coli* deve replicar 4,6 milhões de pares de bases, enquanto uma célula diploide humana precisa replicar mais de 6 bilhões de pares de bases. Em segundo lugar, a informação genética para a *E. coli* está contida em 1 cromossomo, ao passo que, nos seres humanos, deve haver replicação de 23 pares de cromossomos. Por fim, enquanto o cromossomo de *E. coli* é circular, os cromossomos humanos são lineares. A não ser que sejam tomadas contramedidas, os cromossomos lineares estão sujeitos a encurtamento a cada ciclo de replicação.

Os primeiros dois desafios são resolvidos com o uso de múltiplas origens de replicação. Nos seres humanos, a replicação requer cerca de 30.000 origens de replicação, contendo, cada cromossomo, várias centenas. Cada origem de replicação é o ponto inicial para uma unidade de replicação ou *replicon*. Diferentemente da *E. coli*, as origens de replicação nos seres humanos não contêm regiões de sequência nitidamente definida. Em vez disso, as sequências ricas em AT mais amplamente definidas são os sítios ao redor dos quais ocorre a montagem dos *complexos de origem de replicação* (ORC).

1. *A montagem dos ORC constitui a primeira etapa na preparação para a replicação*. Nos seres humanos, o ORC é composto de seis proteínas diferentes, cada uma delas homóloga à DnaA. Essas proteínas tendem a se juntar, formando uma estrutura hexamérica análoga à montagem formada pela DnaA.

2. *Fatores de permissão recrutam uma helicase que expõe fitas simples de DNA.* Após a montagem do ORC, são recrutadas proteínas adicionais, incluindo Cdc6, um homólogo das subunidades de ORC e Cdt1. Por sua vez, essas proteínas recrutam uma helicase hexamérica com seis subunidades

distintas, denominadas Mcm^2-7. Essas proteínas, incluindo a helicase, são algumas vezes designadas como *fatores de permissão*, visto que elas possibilitam a formação do complexo de iniciação. Uma vez formado o complexo de iniciação, a Mcm^2-7 separa as fitas de DNA parental, e as fitas simples são estabilizadas pela ligação da *proteína de replicação A*, uma proteína de ligação do DNA de fita simples.

3. *Duas polimerases distintas são necessárias para copiar um replicon eucariótico*. Uma polimerase iniciadora, denominada *polimerase* α, inicia a replicação, porém é logo substituída por uma enzima mais processiva. Esse processo é denominado *mudança de polimerase*, visto que uma polimerase foi substituída por outra. Essa segunda enzima, denominada *DNA polimerase* δ, constitui a principal polimerase de replicação nos eucariotos (Tabela 28.1).

Tabela 28.1 Alguns tipos de DNA polimerases.

Nome	Função
Polimerases procarióticas	
DNA polimerase I	Elimina o iniciador e preenche as lacunas na fita defasada
DNA polimerase II (polimerase sujeita a erro)	Reparo do DNA
DNA polimerase III	Principal enzima da síntese de DNA
Polimerases eucarióticas	
DNA polimerase α	Polimerase iniciadora
Subunidade primase	Sintetiza o RNA iniciador
Unidade de DNA polimerase	Adiciona um segmento de cerca de 20 nucleotídios ao inicador
DNA polimerase β (polimerase sujeita a erro)	Reparo do DNA
DNA polimerase δ	Principal enzima da síntese de DNA

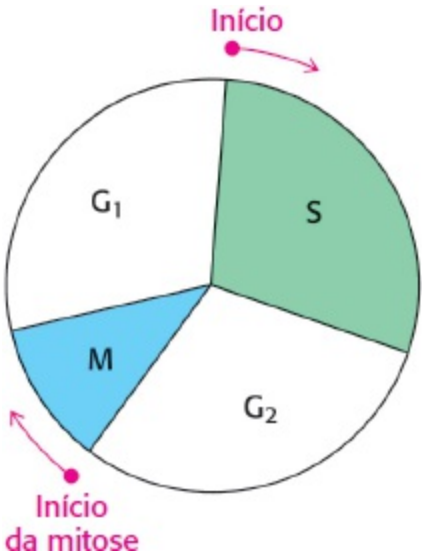


Figura 28.27 Ciclo celular eucariótico. A replicação do DNA e a divisão celular precisam ocorrer de modo altamente coordenado nos eucariotos. A mitose (M) ocorre apenas após a síntese de DNA (S). Dois intervalos (G_1 e G_2) no tempo separam os dois processos.

A replicação começa com a ligação da DNA polimerase α. Essa enzima inclui uma subunidade de primase, que é utilizada na síntese do *primer* (iniciador) de RNA, bem como uma DNA polimerase ativa. Após a adição de um segmento de cerca de 20 desoxinucleotídios ao *primer* por essa polimerase, outra proteína de replicação, denominada *fator de replicação C* (RFC), desloca a DNA polimerase α. O fator de replicação C atrai um grampo de deslizamento, denominado *antígeno nuclear de proliferação celular* (PCNA, *do inglês proliferating cell nuclear antigen*), que é homólogo à subunidade β_2 da polimerase III de *E. coli*. A ligação do PCNA à DNA polimerase δ torna a enzima altamente processiva e adequada para longos segmentos de replicação. A replicação continua em ambos os sentidos a partir da origem de replicação até que *replicons* adjacentes se encontrem e se fundam. Os *primers* de RNA são removidos, e os fragmentos de DNA são ligados pela DNA ligase.

O uso de múltiplas origens de replicação exige mecanismos para assegurar que cada sequência seja replicada, uma vez e apenas uma única vez. Os eventos de replicação do DNA nos eucariotos estão ligados ao *ciclo celular* eucariótico (Figura 28.27). Os processos de síntese de DNA e divisão celular são coordenados no ciclo celular, de modo que a replicação de todas as sequências de DNA é completada antes que a célula progrida para a fase seguinte do ciclo. Essa coordenação requer vários *pontos de verificação*, que controlam a progressão ao longo do ciclo. Uma família de pequenas proteínas, denominadas *ciclinas*, é sintetizada e degradada pelo proteassoma no curso do ciclo celular. As ciclinas atuam por meio de sua ligação a *proteína quinases dependentes de ciclo* específicas, ativando-as. Uma dessas quinases, a quinase 2 dependente de ciclina (cdk2, *do inglês cyclin-dependent kinase 2*), liga-se a montagens nas origens de replicação e regula a replicação por vários mecanismos entrelaçados.

Os telômeros são estruturas singulares nas extremidades de cromossomos lineares

Enquanto os genomas de praticamente todos os procariotos são circulares, os cromossomos dos seres humanos e de outros eucariotos são lineares. As extremidades livres das moléculas lineares de DNA introduzem várias complicações, que precisam ser resolvidas por enzimas especiais. Em particular a replicação completa das extremidades do DNA é difícil, visto que as polimerases só atuam no sentido 5′ → 3′. A fita defasada teria uma extremidade 5′ incompleta após a remoção do *primer* de RNA. Cada ciclo de replicação encurtaria ainda mais o cromossomo.

O primeiro indício de como solucionar esse problema veio de análises de sequências das extremidades dos cromossomos, que são denominadas *telômeros* (do grego *telos*, "uma extremidade"). O DNA telomérico contém centenas de repetições em série de uma sequência de seis nucleotídios. Uma das fitas é rica em G na extremidade 3′ e é ligeiramente mais longa do que a outra fita. Nos seres humanos, a sequência repetida rica em G é AGGGTT.

A estrutura adotada pelos telômeros foi extensamente investigada. Evidências recentes sugerem que eles podem formar grandes alças duplas (Figura 28.28). Foi proposto que a região de fita simples na extremidade da estrutura faz uma alça para trás, formando um DNA dúplex com outra parte da sequência repetida, deslocando uma parte do dúplex telomérico original. Essa estrutura

semelhante a uma alça é formada e estabilizada por proteínas específicas de ligação de telômero. Essas estruturas esconderiam e protegeriam bem a ponta do cromossomo.

Figura 28.28 Modelo proposto para os telômeros. Um segmento de fita simples da fita rica em G estende-se a partir da extremidade do telômero. Em um modelo para telômeros, essa região de fita simples invade o dúplex, formando uma grande alça dúplex.

Os telômeros são replicados pela telomerase, uma polimerase especializada que carrega o seu próprio molde de RNA

Como são produzidas as sequências repetidas? Uma enzima, denominada *telomerase*, que desempenha essa função, foi purificada e caracterizada. Quando um iniciador terminado em GGTT é acrescentado à telomerase humana na presença de desoxinucleosídio trifosfatos, são geradas as sequências GGTTAGGGTT e GGTTAGGGTTAGGGTT, bem como produtos maiores. Elizabeth Blackburn e Carol Greider descobriram que a enzima que adiciona as repetições contém uma molécula de RNA que serve como molde para o alongamento da fita rica em G (Figura 28.29). Por conseguinte, a telomerase transporta a informação necessária para produzir as sequências dos telômeros. O número exato de sequências repetidas não é crucial.

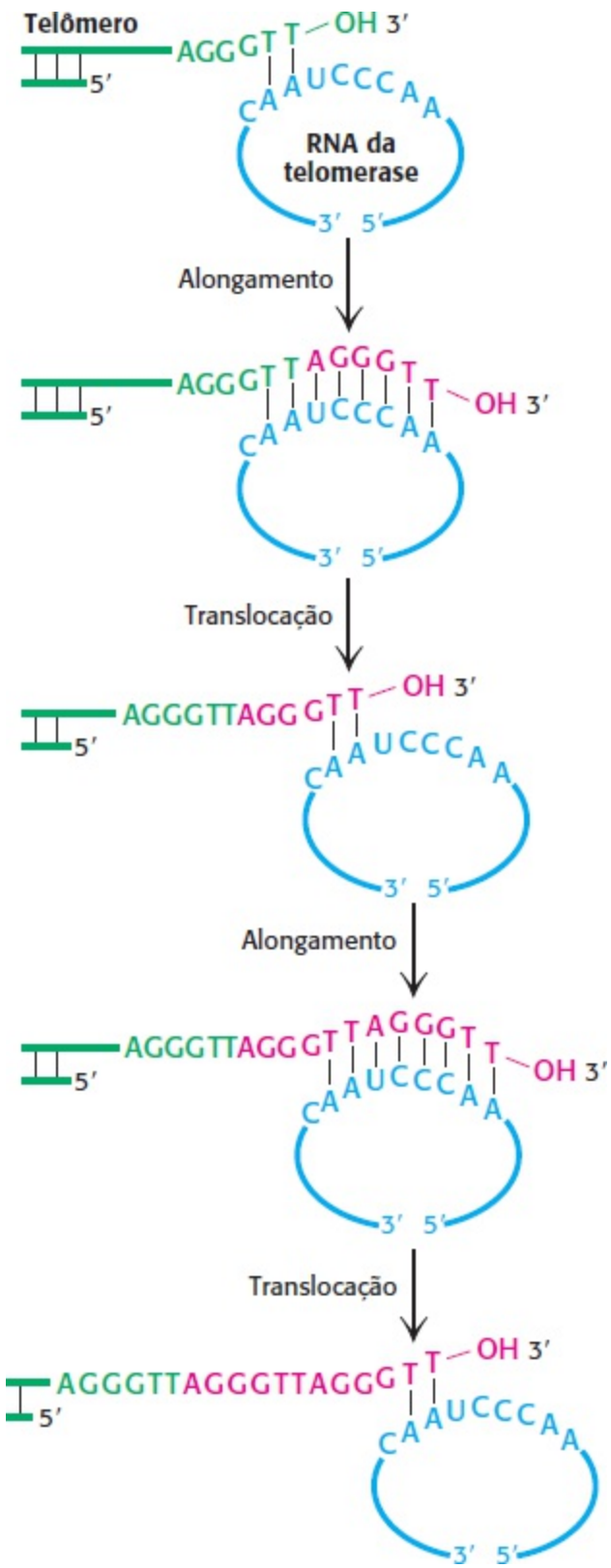


Figura 28.29 Formação do telômero. Mecanismo de síntese da fita rica em G do DNA telomérico. O molde de RNA da telomerase é mostrado em azul, e os nucleotídios acrescentados à fita rica em G do iniciador (*primer*) são mostrados em vermelho. [De E. H. Blackburn. *Nature* 350:569-573, 1991.]

Subsequentemente, foi também identificada uma proteína componente das telomerases. Esse componente está relacionado com transcriptases reversas, enzimas inicialmente descobertas em retrovírus, que copiam o RNA em DNA. Assim, a *telomerase é uma transcriptase reversa especializada que carrega o seu próprio molde*. Em geral, a telomerase é expressa em altos níveis apenas nas células com rápido crescimento. Por conseguinte, os telômeros e a telomerase podem desempenhar papéis importantes na biologia celular do câncer e no envelhecimento celular.

Como as células cancerosas expressam altos níveis de telomerase, o que não ocorre na maioria das células normais, a telomerase constitui um alvo potencial para a terapia antineoplásica. Diversas abordagens para bloquear a expressão da telomerase ou a sua atividade estão em fase de pesquisa para o tratamento e a prevenção do câncer.

28.4 Muitos tipos de dano ao DNA podem ser reparados

Vimos como até mesmo genomas muito grandes e complexos podem, em princípio ser replicados com considerável fidelidade. Entretanto, o DNA é danificado tanto durante a replicação quanto em outros processos. O dano ao DNA pode ser simples, como a incorporação incorreta de uma única base, ou pode assumir formas mais complexas, como a modificação química de bases, ligações cruzadas químicas entre as duas fitas da dupla-hélice ou quebras em um ou em ambos os arcabouços de fosfodiéster. Os resultados podem ser a morte ou a transformação celular, alterações na sequência do DNA que podem ser herdadas pelas futuras gerações ou bloqueio do próprio processo de replicação do DNA. Diversos sistemas de reparo do DNA evoluíram para reconhecer esses defeitos e, em muitos casos, restaurar a molécula de DNA à sua forma não danificada. Começaremos com algumas das fontes de dano ao DNA.

Podem surgir erros durante a replicação do DNA

Erros introduzidos no processo de replicação constituem a fonte mais simples de lesão da dupla-hélice. Com a adição de cada base, existe a possibilidade de que uma base incorreta possa ser incorporada, formando um par de bases não Watson-Crick. Esses pares de bases diferentes do modelo de Watson-Crick podem distorcer localmente a dupla-hélice de DNA. Além disso, esses pareamentos incorretos podem ser *mutagênicos, isto é*, podem resultar em alterações permanentes na sequência do DNA. Quando ocorre replicação de uma dupla-hélice contendo um par de bases diferente do modelo de Watson-Crick, as duplas-hélices-filhas têm sequências diferentes, visto que a base incorretamente pareada tem muita probabilidade de emparelhar com o seu parceiro do modelo de Watson-Crick. Outros erros além dos pareamentos incorretos incluem inserções, deleções e quebras em uma ou em ambas as fitas. Além disso, polimerases de replicação podem bloquear ou até mesmo desprender-se por completo de um molde danificado. Em consequência, a replicação do genoma pode ser interrompida antes de estar completa.

Diversos mecanismos foram desenvolvidos durante a evolução para lidar com essas interrupções, incluindo DNA polimerases especializadas, capazes de replicar o DNA por meio de muitas lesões. Uma desvantagem é que essas polimerases são substancialmente mais propensas a erros do que as polimerases normais de replicação. Entretanto, essas *polimerases propensas a erro* possibilitam o término de uma sequência projetada do genoma, que pode ser pelo menos parcialmente corrigido por processos de reparo do DNA. A recombinação do DNA (Seção 28.5) fornece um mecanismo adicional para recuperar interrupções na replicação do DNA.

As bases podem ser danificadas por agentes oxidantes, agentes alquilantes e luz

Diversos agentes químicos podem alterar bases específicas dentro do DNA após o término da replicação. Esses agentes mutagênicos incluem espécies reativas de oxigênio, como o radical

hidroxila. Por exemplo, o radical hidroxila reage com a guanina, formando 8-oxoguanina. A 8-oxoguanina é mutagênica, visto que ela frequentemente emparelha com a adenina, em lugar da citosina, na replicação do DNA. Sua escolha do parceiro no pareamento difere daquela da guanina, visto que utiliza uma borda diferente da base para formar pares de bases (Figura 28.30). A desaminação é outro processo potencialmente deletério. Por exemplo, a adenina pode ser desaminada para formar hipoxantina (Figura 28.31). Esse processo é mutagênico, pois a hipoxantina emparelha com a citosina, e não com a timina. A guanina e a citosina também podem ser desaminadas, produzindo bases que emparelham diferentemente da base original.

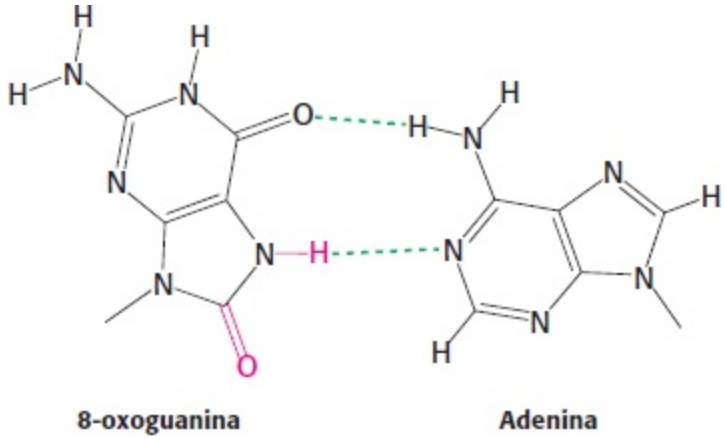


Figura 28.30 Par de bases de oxoguanina-adenina. Quando a guanina é oxidada a 8-oxoguanina, a base danificada pode formar um par de bases com a adenina por meio de uma borda da base que normalmente não participa na formação de par de bases.

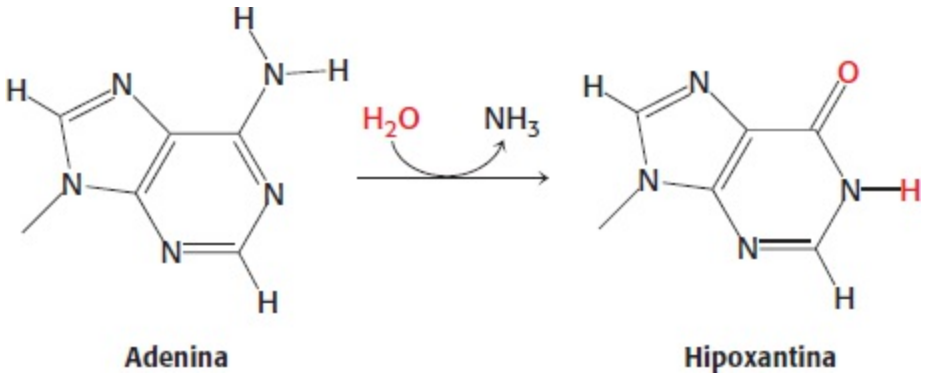


Figura 28.31 Desaminação da adenina. A base adenina pode ser desaminada para formar hipoxantina. A hipoxantina forma pares de bases com a citosina, de modo semelhante ao da guanina; assim, a reação de desaminação pode resultar em mutação.

Além da oxidação e desaminação, as bases nucleotídicas estão sujeitas a alquilação. Os centros eletrofílicos podem ser atacados por nucleófilos, como o N-7 da guanina e da adenina, formando produtos de adição alquilados. Alguns compostos são convertidos em eletrófilos altamente ativos pela ação de enzimas que normalmente desempenham um papel na desintoxicação. Um exemplo marcante é a aflatoxina B_1, um composto produzido por fungos que crescem em amendoins e outros alimentos. Uma enzima do citocromo P450 (p. 787) converte esse composto em um epóxido altamente reativo (Figura 28.32). Esse agente reage com o átomo N-7 da guanosina, formando um produto de adição mutagênico que frequentemente leva a uma transversão de G-C para T-A.

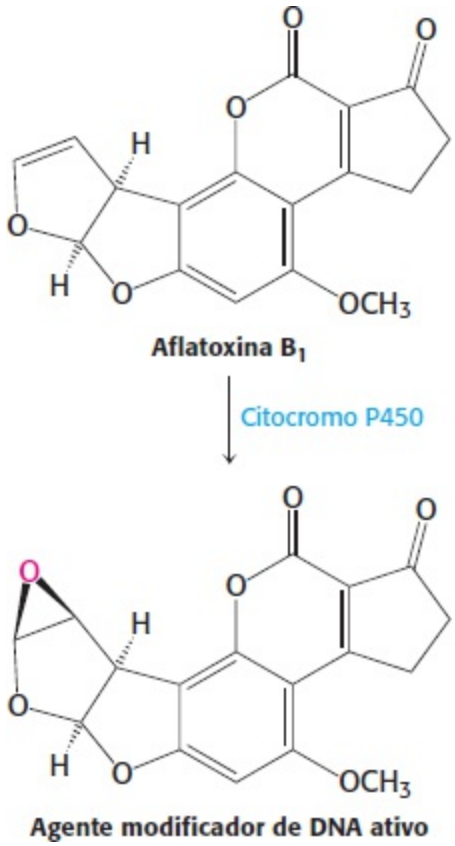


Figura 28.32 Ativação da aflatoxina. O composto, que é produzido por fungos que crescem em amendoins, é ativado pelo citocromo P450, produzindo uma espécie altamente reativa que modifica bases como a guanina no DNA, resultando em mutações.

O componente ultravioleta da luz solar é um agente abundante causador de lesão do DNA. Seu principal efeito consiste em ligar covalentemente resíduos de pirimidinas adjacentes ao longo de uma fita de DNA (Figura 28.33). Esse dímero de pirimidinas não pode se ajustar à dupla-hélice, de modo que a replicação e a expressão gênicas são bloqueadas até que a lesão seja removida.

Um dímero de timina é um exemplo de ligação cruzada *intra*fita, visto que ambas as bases participantes estão na mesma fita da dupla-hélice. Ligações cruzadas entre bases de fitas opostas também podem ser introduzidas por vários agentes. Por exemplo, os psoralenos são compostos produzidos por uma erva chinesa que forma essas ligações cruzadas *inter*fitas (Figura 28.34). As ligações cruzadas interfitas interrompem a replicação, visto que elas impedem a separação das fitas.

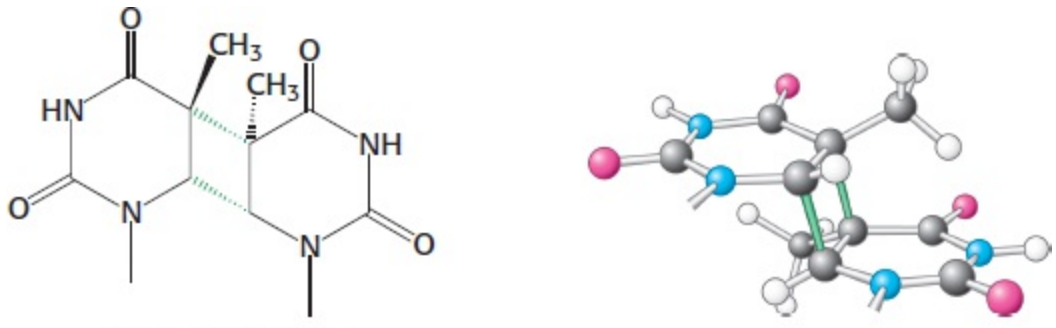


Figura 28.33 Dímero de duas bases de timinas com ligação cruzada. A luz ultravioleta induz ligações cruzadas entre pirimidinas adjacentes ao longo de uma fita de DNA.

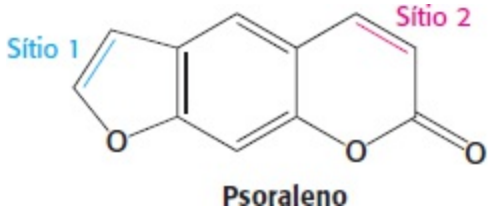


Figura 28.34 Um agente produtor de ligações cruzadas. O composto psoraleno e seus derivados podem formar ligações cruzadas interfitas por meio de dois sítios reativos que podem formar produtos de adição com bases nucleotídicas.

A radiação eletromagnética de alta energia, como os raios X, pode danificar o DNA, produzindo altas concentrações de espécies reativas em solução. A exposição aos raios X pode induzir vários tipos de lesão ao DNA, incluindo quebras de fita simples e de dupla fita no DNA. Essa capacidade de provocar lesão do DNA levou Hermann Muller a descobrir os efeitos mutagênicos dos raios X em *Drosophila*, em 1927. Essa descoberta contribuiu para o desenvolvimento da *Drosophila* como um dos principais organismos para estudos genéticos.

Vários sistemas podem detectar lesões do DNA e proceder a seu reparo

Para proteger a mensagem genética, a maioria dos organismos dispõe de uma ampla variedade de sistemas de reparo do DNA. Muitos sistemas efetuam o reparo do DNA utilizando a informação da sequência da fita não comprometida. Esses sistemas de replicação de fita simples seguem um mecanismo semelhante:

1. Reconhecer a(s) base(s) causadora(s).

2. Remover a(s) base(s) causadora(s).

3. Reparar a lacuna resultante com uma DNA polimerase e uma DNA ligase.

Consideraremos brevemente exemplos de diversas vias de reparo. Embora muitos desses exemplos sejam obtidos de *E. coli*, existem sistemas de reparo correspondentes na maioria dos outros organismos, incluindo os seres humanos.

As próprias DNA polimerases de replicação são capazes de corrigir muitos pareamentos inadequados do DNA produzidos durante a replicação. Por exemplo, a subunidade ε da DNA polimerase III de *E. coli* funciona como uma exonuclease de 3′ para 5′. Esse domínio remove nucleotídios pareados inadequadamente a partir da extremidade 3′ do DNA por hidrólise. Como a enzima reconhece se uma base recém-adicionada está correta? À medida que uma nova fita de DNA é sintetizada, ela é submetida a *revisão*. Se tiver uma base incorreta inserida, a síntese de DNA torna-se lenta, devido à dificuldade de deslizar um par de bases que não obedece ao modelo de Watson-Crick na polimerase. Além disso, a base pareada de modo incorreto está fracamente ligada e, portanto, pode flutuar na posição. O retardo em consequência da redução da velocidade proporciona tempo para que essas flutuações removam a fita recém-sintetizada do sítio ativo da polimerase, levando-o até o sítio ativo da exonuclease (Figura 28.35). Nesse local, o DNA é degradado, um nucleotídio de cada vez, até que retorne ao sítio ativo da polimerase, e a síntese prossiga.

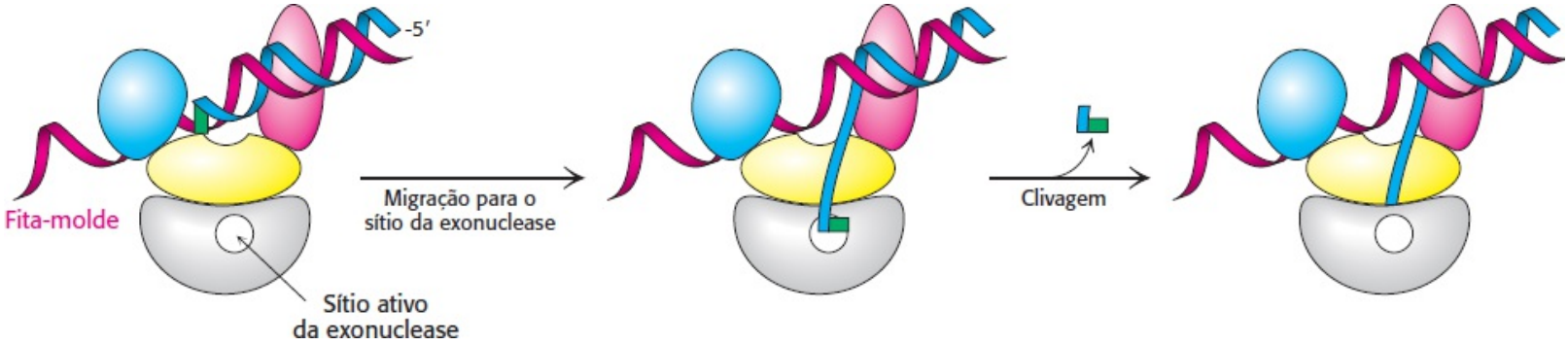


Figura 28.35 Revisão. A cadeia polinucleotídica em crescimento deixa, ocasionalmente, o sítio da polimerase e migra para o sítio ativo da exonuclease. Nesse sítio, um ou mais nucleotídios são excisados da cadeia recém-sintetizada, removendo bases potencialmente incorretas.

Existe um segundo mecanismo presente em praticamente todas as células para corrigir erros cometidos durante a replicação, mas que não foram corrigidos pela revisão (Figura 28.36). Os sistemas de *reparo de pareamento impróprio* são constituídos por pelo menos duas proteínas: uma para detectar o pareamento impróprio e outra para recrutar uma endonuclease que cliva a fita recém-sintetizada de DNA próximo à lesão para facilitar o reparo. Em *E. coli*, essas proteínas são denominadas MutS e MutL, enquanto a endonuclease é denominada MutH.

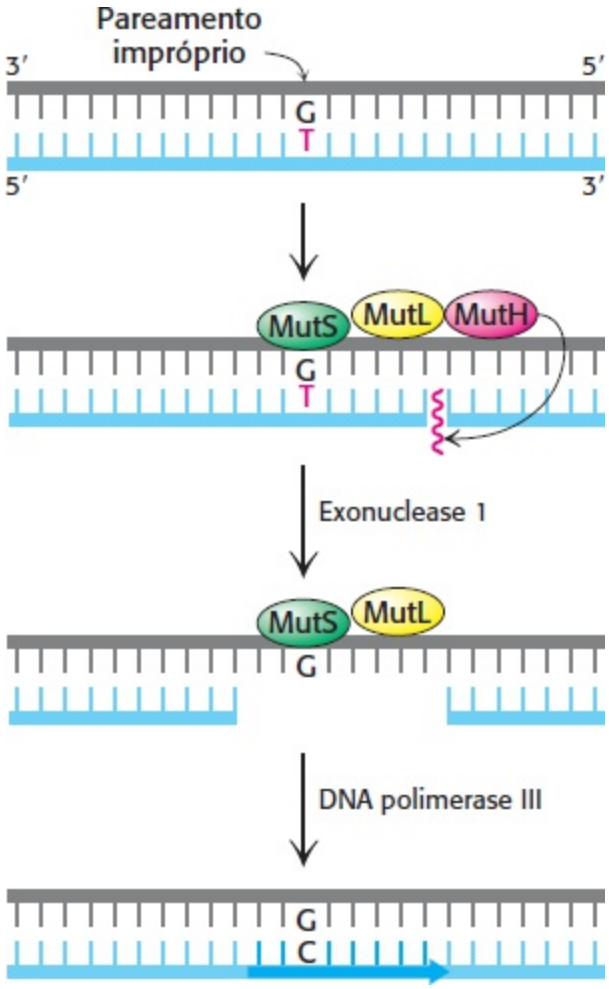


Figura 28.36 Reparo de pareamento impróprio. O reparo de pareamento impróprio em *E. coli* é iniciado pela interação das proteínas MutS, MutL e MutH. Um pareamento incorreto G-T é reconhecido pela MutS. A MutH cliva o arcabouço na vizinhança do pareamento impróprio. Um segmento da fita de DNA contendo a T incorreta é removido pela exonuclease I e sintetizado novamente pela DNA polimerase III. [De R. F. Service. *Science* 263:1559-1560, 1994.]

Outro mecanismo de reparo de DNA é o *reparo direto*, como, por exemplo, a clivagem fotoquímica de dímeros de pirimidina. Quase todas as células contêm uma *enzima fotorreativante*, denominada *DNA fotoliase*. A enzima de *E. coli*, uma proteína de 35 kDa que contém os cofatores N^5,N^{10}-meteniltetra-hidrofolato e flavina adenina dinucleotídio (FAD), liga-se à região distorcida do DNA. A enzima utiliza a energia luminosa – especificamente, a absorção de um fóton pela coenzima N^5, N^{10}-meteniltetra-hidrofolato –, formando um estado excitado que cliva o dímero em suas bases componentes.

A excisão de bases modificadas, como a 3-metiladenina pela enzima de *E. coli AlkA*, é um exemplo de *reparo por excisão de bases*. A ligação dessa enzima ao DNA danificado rebate a base afetada da dupla-hélice do DNA para o sítio ativo da enzima (Figura 28.37). Em seguida, a enzima atua como *glicosilase*, clivando a ligação glicosídica para liberar a base danificada. Nesse estágio, o arcabouço de DNA está intacto, porém uma base está faltando. Essa lacuna é denominada *sítio AP*, visto que é apurínico (desprovido de A ou de G) ou apirimidínico (desprovido de C ou de T). Uma *AP endonuclease* reconhece esse defeito e corta o arcabouco adjacente à base ausente. A *desoxirribose fosfodiesterase* remove a unidade residual de desoxirribose fosfato, e a DNA polimerase I insere um nucleotídio não danificado, conforme determinado pela base presente na fita complementar não danificada. Por fim, a fita reparada é selada pela DNA ligase.

Um dos exemplos mais bem compreendidos do *reparo por excisão de nucleotídios* é utilizado para a excisão de um dímero de pirimidina. Três atividades enzimáticas são essenciais para esse processo de reparo em *E. coli* (Figura 28.38). Em primeiro lugar, um complexo enzimático, que consiste nas proteínas codificadas pelos genes *uvrABC*, detecta a distorção produzida pelo dano ao DNA. Em seguida, a enzima UvrABC corta o DNA danificado em dois locais, a 8 nucleotídios distantes do local de lesão no lado 5′ e a 4 nucleotídios distantes no lado 3′. O oligonucleotídio de 12 resíduos excisado por essa *excinuclease* (do latim *exci*, "cortar fora") altamente específica afasta-se. A DNA polimerase I entra na lacuna para proceder à síntese de reparo. A extremidade 3′ da fita cortada é o iniciador (*primer*), e a fita complementar intacta atua como molde. Por fim, a extremidade 3′ do segmento recém-sintetizado de DNA e a parte original da cadeia de DNA são unidas pela DNA ligase.

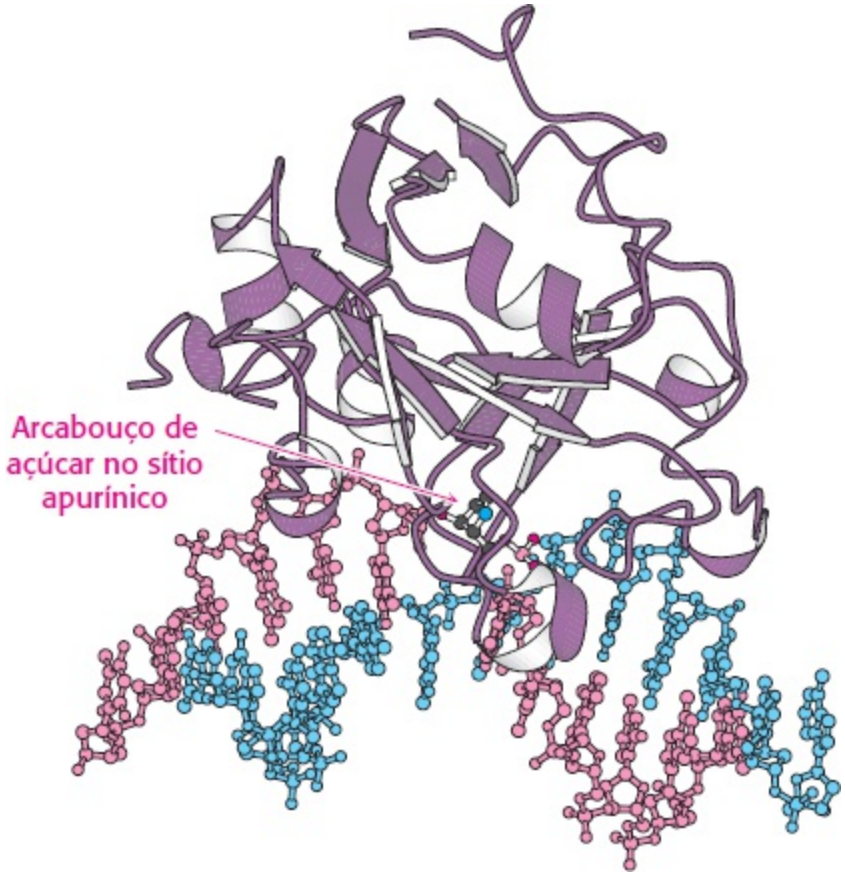


Figura 28.37 Estrutura da enzima de reparo do DNA. A figura mostra um complexo entre a enzima de reparo do DNA AlkA e um análogo de uma molécula de DNA sem uma base purínica (um sítio apurínico). *Observe* que o arcabouço de açúcar no sítio apurínico é rebatido da dupla-hélice para o sítio ativo da enzima. [Desenhada a partir de 1BNK.pdb.]

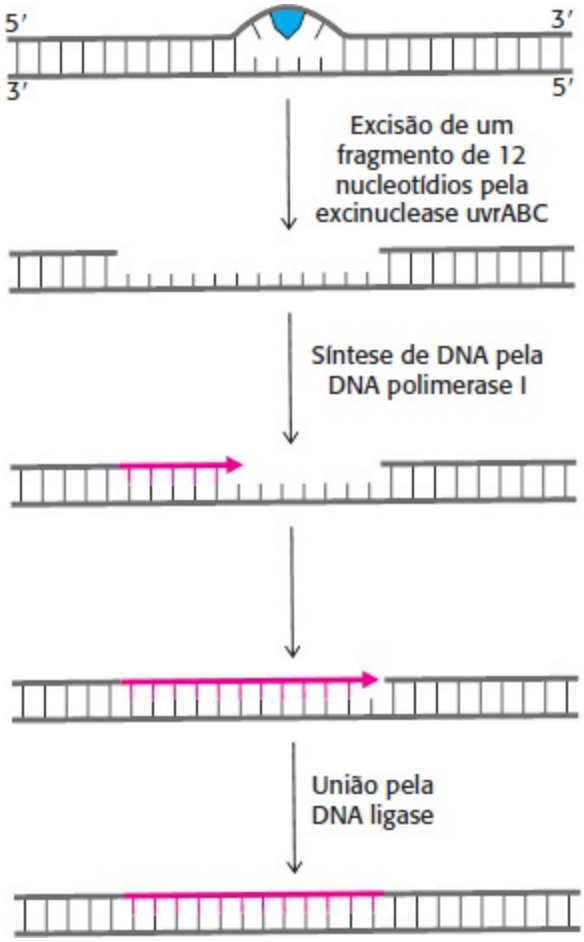


Figura 28.38 Reparo por excisão de nucleotídios. O reparo de uma região do DNA contendo um dímero de timina pela ação sequencial de uma excinuclease específica, uma DNA polimerase e uma DNA ligase. O dímero de timina é mostrado

em azul, e a nova região de DNA, em vermelho. [De P. C. Hanawalt. *Endevour* 31:83, 1982.]

A DNA ligase é capaz de selar quebras simples em uma fita do arcabouço de DNA. Entretanto, são necessários mecanismos alternativos para efetuar o reparo de quebras em ambas as fitas que estejam próximas o suficiente para separar o DNA em duas duplas-hélices. Vários mecanismos distintos são capazes de proceder ao reparo dessa lesão. Um mecanismo, a *junção de extremidades não homólogas* (NHEJ, *do inglês nonhomologous end joining*), não depende de outras moléculas de DNA na célula. Na NHEJ, as extremidades de dupla fita livres são ligadas por um heterodímero de duas proteínas, Ku70 e Ku80. Essas proteínas estabilizam as extremidades e as marcam para manipulações subsequentes. Por meio de mecanismos que ainda não estão bem elucidados, os heterodímeros Ku70/80 atuam como cabos usados por outras proteínas para juntar as duas extremidades de dupla fita, de modo que as enzimas possam fechar a quebra.

Mecanismos alternativos de reparo de quebras de fita dupla podem operar se houver na célula um segmento intacto de DNA de fita dupla com uma sequência idêntica ou muito semelhante. Esses processos de reparo utilizam a recombinação homóloga, apresentada na Seção 28.5.

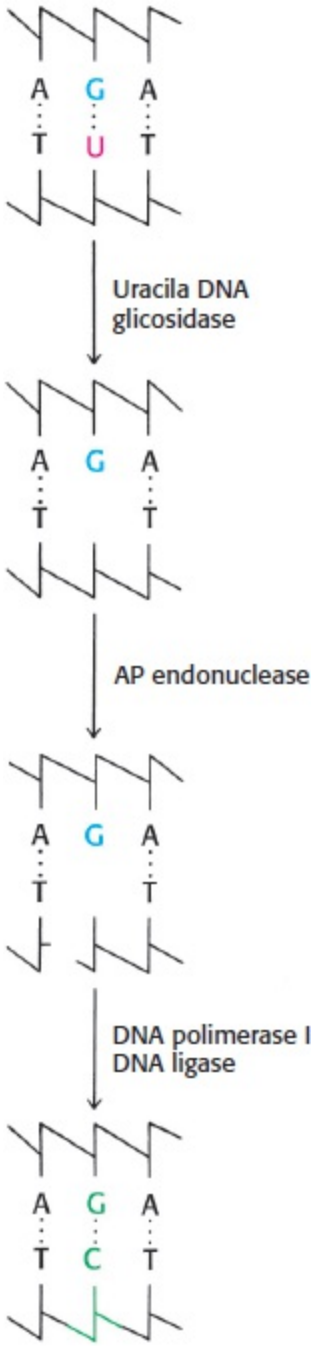


Figura 28.39 Reparo da uracila. As bases de uridina no DNA, formadas pela desaminação da citidina, são excisadas e substituídas pela citidina.

A presença de timina em lugar de uracila no DNA possibilita o reparo da citosina desaminada

A presença de timina no DNA, em lugar de uracila, conforme observado no RNA, foi um enigma durante muitos anos. Ambas as bases emparelham com a adenina. A única diferença entre elas reside em um grupo metila na timina, em lugar do átomo de hidrogênio em C-5 na uracila. Por que uma base metilada é empregada no DNA e não no RNA? A existência de um sistema de reparo ativo para corrigir a desaminação da citosina fornece uma solução convincente para esse enigma.

A citosina no DNA sofre desaminação espontânea em uma velocidade perceptível, formando uracila. A desaminação da citosina é potencialmente mutagênica, visto que a uracila emparelha com a adenina, de modo que uma das fitas-filhas irá conter um par de bases U-A, em lugar do par original C-G. Essa mutação é evitada por um sistema de reparo que reconhece a uracila como estranha ao

DNA (Figura 28.39). A enzima de reparo, a *uracila DNA glicosilase*, é homóloga à AlkA. A enzima hidrolisa a ligação glicosídica entre as frações uracila e desoxirribose, porém não ataca nucleotídios contendo timina. O sítio AP gerado é reparado para a reinserção de citosina. Por conseguinte, *o grupo metila na timina representa uma marcação que distingue a timina da citosina desaminada*. Se a timina não fosse utilizada no DNA, a uracila no local correto seria indistinguível da uracila formada por desaminação. O defeito persistiria sem ser reconhecido, e ocorreria necessariamente mutação de um par de bases C-G para U-A em uma das moléculas-filhas de DNA. Essa mutação é evitada por um sistema de reparo que procura a uracila e deixa a timina sozinha. *A timina é utilizada em lugar da uracila no DNA para aumentar a fidelidade da mensagem genética*.

Algumas doenças genéticas são causadas pela expansão de repetições de três nucleotídios

Algumas doenças genéticas são causadas pela presença de sequências de DNA que são inerentemente propensas a erros durante o processo de reparo e replicação. Uma classe particularmente importante dessas doenças caracteriza-se pela presença de longas séries de repetições de três nucleotídios. Um exemplo é a *doença de Huntington*, um distúrbio neurológico autossômico dominante com idade variável de início. Nessa doença, o gene mutado expressa uma proteína no cérebro, denominada *huntingtina*, que contém um segmento de resíduos consecutivos de glutamina. Esses resíduos de glutamina são codificados por um arranjo em série de sequências CAG dentro do gene. Nos indivíduos não afetados, esse arranjo tem 6 a 31 repetições, ao passo que, nos indivíduos com a doença, ele apresenta 36 a 82 repetições ou mais. Além disso, o arranjo tende a ser mais longo de uma geração para outra. A consequência é um fenômeno denominado *antecipação:* os filhos de um genitor afetado tendem a apresentar sintomas da doença em uma idade mais precoce do que o genitor.

A tendência dessas *repetições de trinucleotídios* a sofrer expansão é explicada pela formação de estruturas alternativas durante o reparo do DNA. Durante a clivagem do arcabouço de DNA, parte do arranjo pode fazer uma alça sem comprometer o pareamento de bases fora dessa região. Em seguida, durante a replicação, a DNA polimerase amplifica essa fita pelo restante do arranjo, resultando em um aumento na quantidade de cópias da sequência de trinucleotídios.

Várias outras doenças neurológicas se caracterizam pela expansão de arranjos de repetições de trinucleotídios. Como esses longos segmentos de aminoácidos repetidos provocam doença? No caso da huntingtina, parece que os segmentos de poliglutamina tornam-se cada vez mais propensos a agregar-se à medida que aumenta o seu tamanho; as consequências adicionais dessa agregação ainda estão em fase de investigação.

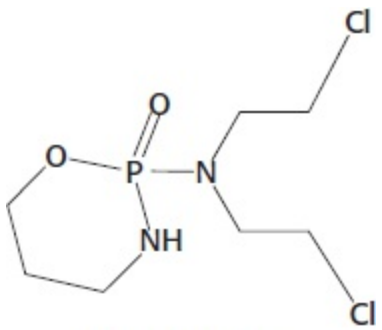
Muitos cânceres são causados por reparo defeituoso do DNA

Conforme descrito no Capítulo 14, os cânceres são causados por mutações em genes associados ao controle do crescimento. Os defeitos nos sistemas de reparo do DNA aumentam a frequência global de mutações e, portanto, a probabilidade de mutações causadoras de câncer. Com efeito, tem sido notável a coesão entre os estudos de mutações que predispõem as pessoas ao câncer e os estudos de reparo do DNA em organismos-modelo, revelando a bioquímica das vias de reparo do DNA. Os genes para proteínas de reparo do DNA são, frequentemente, *genes supressores de tumores, isto é*, suprimem o desenvolvimento de tumores quando pelo menos uma cópia do gene está

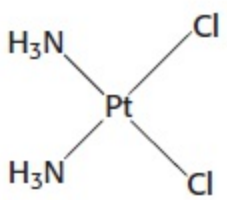
livre de mutação deletéria. Entretanto, quando ocorre mutação de ambas as cópias de um gene, há desenvolvimento de tumores em taxas maiores que as da população em geral. Os indivíduos que herdam defeitos em um único alelo supressor tumoral não desenvolvem necessariamente câncer, porém são suscetíveis ao desenvolvimento da doença, visto que apenas a cópia normal remanescente do gene precisa desenvolver um novo defeito para desencadear o desenvolvimento de câncer.

Considere, por exemplo, a *xerodermia pigmentosa*, uma rara doença cutânea humana. A pele de uma pessoa afetada é extremamente sensível à luz solar ou à luz ultravioleta. Na infância, alterações graves da pele tornam-se evidentes e agravam-se com o passar do tempo. A pele torna-se seca, e ocorre acentuada atrofia da derme. Aparecem queratoses, as pálpebras apresentam cicatrizes, e a córnea sofre ulceração. Em geral, o câncer de pele desenvolve-se em vários locais. Muitos pacientes morrem antes dos 30 anos em consequência de metástases desses tumores malignos da pele. Estudos de pacientes com xerodermia pigmentosa revelaram a ocorrência de mutações em genes para várias proteínas diferentes. Essas proteínas são componentes da via de reparo por excisão de nucleotídios, incluindo homólogos das subunidades UvrABC.

A ocorrência de defeitos em outros sistemas de reparo pode aumentar a frequência de outros tumores. Por exemplo, o *câncer colorretal hereditário sem polipose* (HNPCC, *do inglês hereditary nonpolyposis colorectal cancer*, ou *síndrome de Lynch*) resulta de um defeito no reparo de pareamento impróprio do DNA. O HNPCC não é raro – 1 em cada 200 indivíduos podem apresentar esse tipo de câncer. Mutações em dois genes, denominados *hMSH2* e *hMLH1*, são responsáveis pela maioria dos casos dessa predisposição hereditária ao câncer. O achado notável é que esses genes codificam as contrapartes humanas de MutS e MutL de *E. coli*. As mutações em *hMSH2* e *hMLH1 p*rovavelmente possibilitam o acúmulo de mutações em todo o genoma. Com o tempo, genes importantes no controle da proliferação celular tornam-se alterados, resultando no aparecimento de câncer.



Ciclofosfamida



Cisplatina

Nem todos os genes supressores tumorais são específicos de determinados tipos de câncer. *O gene para uma proteína denominada p53 sofre mutação em mais da metade de todos os tumores*. A proteína p53 ajuda a controlar o destino das células danificadas. Em primeiro lugar, desempenha um papel central no reconhecimento da lesão do DNA, particularmente quebras de fitas duplas. Em

seguida, após a identificação da lesão, a proteína promove uma via de reparo do DNA ou ativa a via de apoptose, levando à morte celular. As mutações no gene p53 são, em sua maioria, de natureza esporádica, isto é, ocorrem em células somáticas, em lugar de serem herdadas. Os indivíduos que herdam uma mutação deletéria em uma cópia do gene p53 apresentam *síndrome de Li-Fraumeni* e têm alta probabilidade de desenvolver vários tipos de câncer.

Com frequência, as células cancerosas exibem duas características que as tornam particularmente vulneráveis a agentes que danificam as moléculas de DNA. Em primeiro lugar, dividem-se com frequência, de modo que suas vias de replicação de DNA são mais ativas do que na maioria das células. Em segundo lugar, conforme assinalado anteriormente, as células cancerosas frequentemente apresentam defeitos nas vias de reparo do DNA. Diversos agentes amplamente usados na quimioterapia do câncer, incluindo a ciclofosfamida e a cisplatina, atuam provocando lesões no DNA. As células cancerosas têm menos capacidade de evitar o efeito da lesão induzida do que as células normais, proporcionando uma janela terapêutica para matar especificamente as células cancerosas.

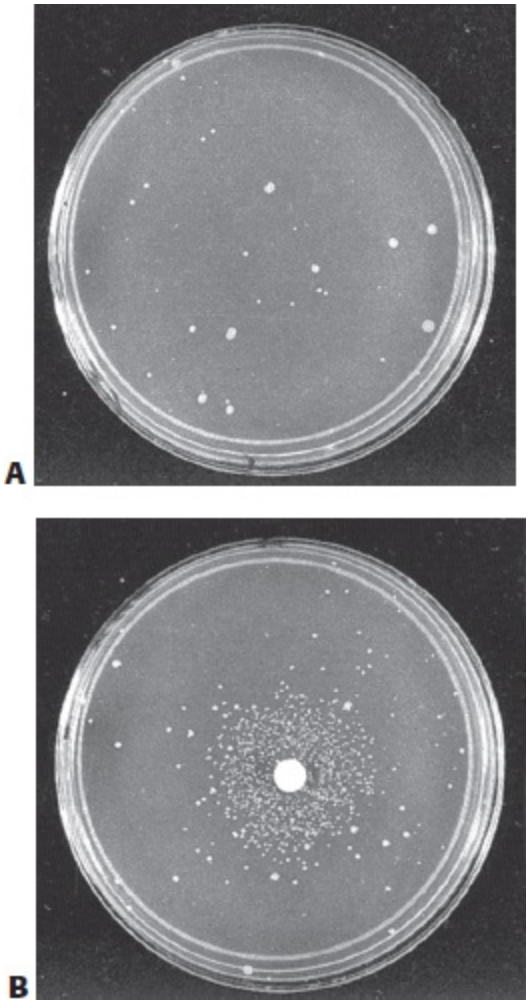


Figura 28.40 Teste de Ames. A Uma placa de Petri contendo cerca de 10^9 bactérias *Salmonella* que não podem sintetizar histidina e (**B**) uma placa de Petri contendo um disco de papel de filtro com um agente mutagênico, que produz uma grande quantidade de revertentes que podem sintetizar histidina. Depois de 2 dias, os revertentes aparecem como anéis de colônias ao redor do disco. A pequena quantidade de colônias visíveis na placa A são revertentes espontâneos. [De B. N. Ames, J. McCann, and E. Yahasake. *Mutat. Res*. 31:347-364, 1975.]

Muitos carcinógenos potenciais podem ser detectados pela sua ação mutagênica em bactérias

Muitos tipos de câncer humano são causados pela exposição a substâncias químicas que causam mutações. É importante identificar esses compostos e determinar a sua potência, de modo que a exposição humana a eles possa ser minimizada. Bruce Ames planejou um teste simples e sensível para a detecção de agentes mutagênicos químicos. No *teste de Ames*, uma camada fina de ágar contendo cerca de 10^9 bactérias de uma linhagem de *Salmonella* especialmente desenvolvida para o teste é colocada em uma placa de Petri. Essas bactérias são incapazes de crescer na ausência de histidina, devido a uma mutação em um dos genes para a biossíntese desse aminoácido. A adição de um agente mutagênico químico ao centro da placa resulta em muitas mutações novas. Uma pequena proporção delas reverte para a mutação original, e a histidina pode ser sintetizada. Esses *revertentes* multiplicam-se na ausência de uma fonte externa de histidina e aparecem como colônias distintas após incubação da placa a 37°C durante 2 dias (Figura 28.40). Por exemplo, 0,5 μg de 2-aminoantraceno produz 11.000 colônias revertentes, em comparação com apenas 30 revertentes espontâneos na sua ausência. Uma série de concentrações de uma substância química pode ser prontamente testada, gerando uma curva de dose-resposta. Essas curvas são habitualmente lineares, sugerindo que não há concentração limiar para a mutagênese.

Algumas das linhagens para teste são responsivas a *substituições de pares de bases*, enquanto outras detectam *deleções ou adições de pares de bases (frameshifts*, mudanças de fases de leitura*)*. A sensibilidade dessas linhagens especialmente desenvolvidas foi intensificada pela deleção genética de seus sistemas de reparo por excisão. Agentes mutagênicos potenciais entram facilmente nas linhagens de teste, visto que a barreira de lipopolissacarídios que normalmente reveste a superfície de *Salmonella* é incompleta nessas linhagens. Uma característica essencial desse sistema de detecção é a inclusão de um *homogeneizado de fígado de mamífero*. Convém lembrar que alguns carcinógenos potenciais, como a aflatoxina, são convertidos em suas formas ativas por sistemas enzimáticos no fígado ou em outros tecidos de mamíferos. As bactérias carecem dessas enzimas, de modo que a placa do teste requer algumas miligramas de homogeneizado de fígado para ativar esse grupo de agentes mutagênicos.

O teste com a *Salmonella* é amplamente usado para ajudar a avaliar os riscos mutagênicos e carcinogênicos de um grande número de substâncias químicas. Esse ensaio bacteriano rápido e de baixo custo de mutagenicidade complementa os levantamentos epidemiológicos e os testes em animais que são necessariamente mais lentos, mais trabalhosos e de custo muito mais elevado. O teste com a *Salmonella* para mutagenicidade é o resultado de estudos das relações gene-proteína em bactérias. Fornece um notável exemplo de como a pesquisa fundamental em biologia molecular pode levar diretamente a avanços importantes na saúde pública.

28.5 A recombinação do DNA desempenha papéis importantes na replicação, no reparo e em outros processos

Os processos associados à replicação do DNA funcionam, em sua maioria, para copiar a mensagem genética o mais fielmente possível. Entretanto, vários processos bioquímicos necessitam da *recombinação* do material genético entre duas moléculas de DNA. Na recombinação genética, duas moléculas-filhas são formadas pela troca de material genético entre duas moléculas parenterais (Figura 28.41). A recombinação é essencial nos seguintes processos.

1. Quando a replicação é interrompida, os processos de recombinação podem reativar o mecanismo de replicação de modo que ela possa continuar.

2. Algumas quebras de fitas duplas no DNA são reparadas por recombinação.

3. Na meiose, a troca limitada de material genético entre cromossomos pareados fornece um mecanismo simples para gerar diversidade genética em uma população.

4. Como veremos no Capítulo 34, a recombinação desempenha um papel crucial na geração da diversidade molecular para os anticorpos e algumas outras moléculas do sistema imune.

5. Alguns vírus empregam vias de recombinação para integrar seu material genético no DNA da célula hospedeira.

6. A recombinação é usada para manipular genes, por exemplo, na geração de camundongos com "nocaute gênico" (gene *knockout*) (Seção 5.4).

A recombinação é mais eficiente entre sequências de DNA que são semelhantes na sua sequência. Na recombinação homóloga, o DNA dúplex parental alinha-se em regiões com semelhança de sequência, e são formadas novas moléculas de DNA por quebra e união de segmentos homólogos.

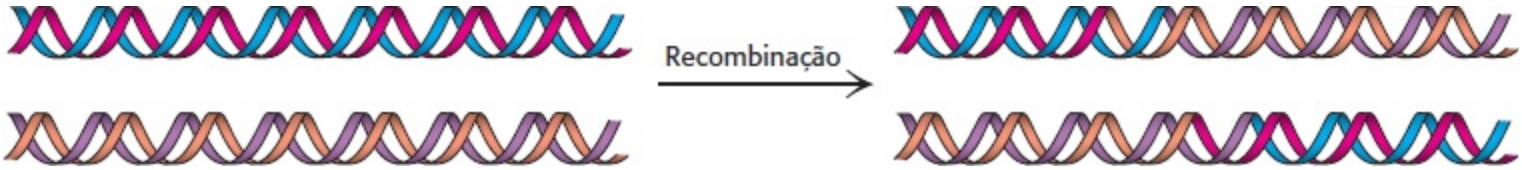


Figura 28.41 Recombinação. Duas moléculas de DNA podem recombinar uma com a outra, formando novas moléculas de DNA que apresentam segmentos de ambas as moléculas parentais.

A proteína RecA pode iniciar a recombinação ao promover a invasão da fita

Em muitas vias de recombinação, uma molécula de DNA com extremidade livre recombina-se com uma molécula de DNA sem extremidades livres disponíveis para interação. As moléculas de DNA com extremidades livres são o resultado comum de quebras de DNA de dupla fita; todavia, podem ser também produzidas durante a replicação do DNA se houver interrupção do complexo de replicação. Esse tipo de recombinação foi extensamente estudado em *E. coli*, mas também ocorre em outros organismos por meio da ação de proteínas homólogas às de *E. coli*. Com frequência, dúzias de proteínas participam no processo completo de recombinação. Entretanto, a proteína-chave é a *RecA*. Para efetuar a troca, o DNA de fita simples desloca uma das fitas da dupla-hélice (Figura 28.42). A estrutura resultante de três fitas é denominada *alça de deslocamento (displacement loop)* ou *alça D*. Esse processo é frequentemente designado como *invasão de fita*. Como a extremidade 3′ livre está agora pareada a uma fita contígua de DNA, ela pode atuar como iniciador (*primer*) para iniciar a síntese de novo DNA. A invasão de fita pode iniciar muitos processos, incluindo o reparo de quebras de fitas duplas e reiniciação do processo de replicação após a separação do aparelho de replicação de seu molde. No reparo de uma quebra, o parceiro de recombinação é uma molécula de DNA intacta com sequência superposta.

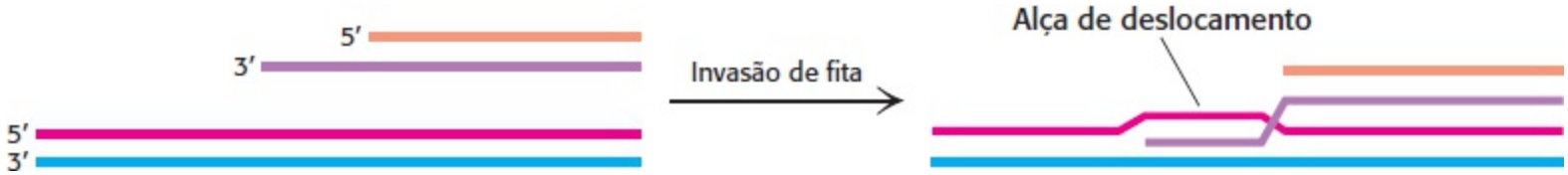


Figura 28.42 Invasão de fita. Esse processo, promovido por proteínas como a RecA, pode iniciar a recombinação.

Algumas reações de recombinação ocorrem por meio de intermediários de junção de Holliday

Nas vias de recombinação para a meiose e alguns outros processos, formam-se intermediários que são compostos de quatro cadeias polinucleotídicas em uma estrutura semelhante a uma cruz. Os intermediários com essas estruturas em forma de cruz são frequentemente designados como *junções de Holliday*, em homenagem à Robin Holliday, que propôs o seu papel na recombinação, em 1964. Esses intermediários foram caracterizados por uma ampla variedade de técnicas, incluindo cristalografia de raios X.

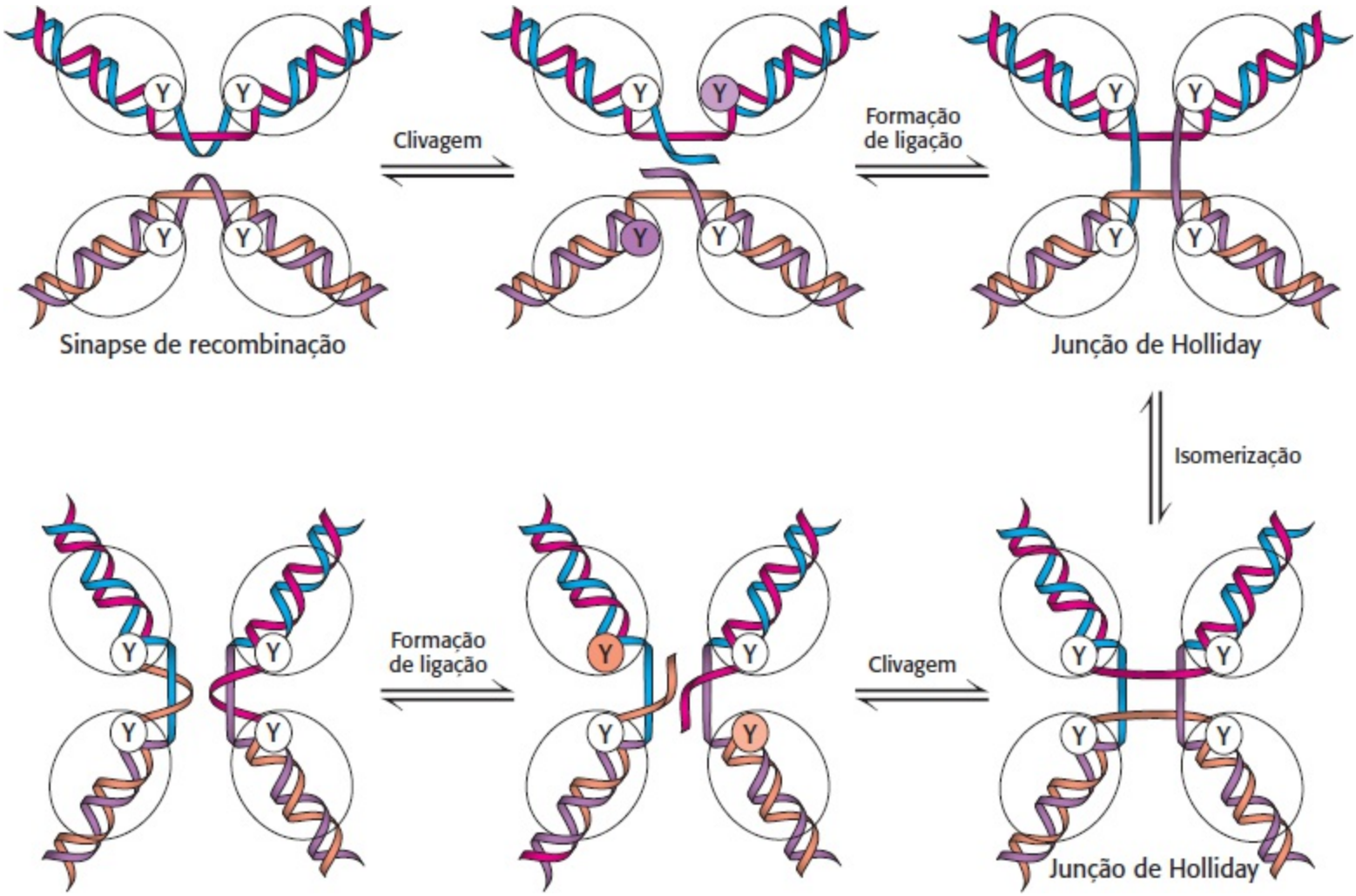


Figura 28.43 Mecanismo de recombinação. A recombinação começa quando duas moléculas de DNA se unem para formar uma sinapse de recombinação. Uma fita de cada dúplex é clivada pela enzima recombinase; a extremidade 3′ de cada uma das fitas clivadas é ligada a um resíduo de tirosina (Y) na enzima recombinase. Formam-se novas ligações fosfodiéster quando uma extremidade 5′ da outra fita clivada no complexo ataca esses produtos de adição de tirosina-DNA. Após isomerização, essas etapas são repetidas para formar os produtos recombinados.

Enzimas específicas, denominadas *recombinases*, ligam-se a essas estruturas e as separam em

hélices duplas de DNA. A Cre recombinase do bacteriófago P1 foi extensamente estudada. O mecanismo começa com a ligação da recombinase aos substratos de DNA (Figura 28.43).

Quatro moléculas da enzima e duas moléculas de DNA juntam-se para formar uma *sinapse de recombinação*. A reação começa com a clivagem de uma fita de cada dúplex. O grupo hidroxila 5′ de cada fita clivada permanece livre, enquanto o grupo fosforila 3′ é ligado a um resíduo específico de tirosina na recombinase. As extremidades 5′ livres invadem o outro dúplex na sinapse e atacam as unidades de DNA-tirosina, formando novas ligações fosfodiéster e liberando os resíduos de tirosina. Essas reações resultam na formação de uma junção de Holliday. Em seguida, essa junção pode sofrer isomerização, formando uma estrutura na qual as cadeias polinucleotídicas no centro da estrutura são reorientadas. A partir dessa junção, os processos de clivagem de fitas e formação de ligações fosfodiéster repetem-se. O resultado é uma sinapse contendo as duas fitas dúplex recombinadas. A dissociação desse complexo gera os produtos recombinados finais.

A Cre catalisa a formação das junções de Holliday, bem como a sua resolução. Em contrapartida, outras proteínas se ligam às junções de Holliday que já haviam sido formadas por outros processos e as separam em dúplices individuais. Em muitos casos, essas proteínas também promovem o processo de migração da ramificação, no qual uma junção de Holliday é movida ao longo das duas duplas-hélices componentes. A migração da ramificação pode afetar os segmentos de DNA que são trocados em um processo de recombinação.

Resumo

28.1 A replicação do DNA ocorre pela polimerização de trifosfatos de desoxirribonucleosídios ao longo de um molde

As DNA polimerases são enzimas dirigidas por moldes, que catalisam a formação de ligações fosfodiéster pelo ataque nucleofílico do grupo hidroxila 3′ no átomo de fósforo mais interno de um desoxirribonucleosídio 5′-trifosfato. A complementaridade de forma entre bases nucleotídicas corretamente pareadas é crucial para assegurar a fidelidade da incorporação de bases. As DNA polimerases não podem iniciar cadeias *de novo*; é necessário um iniciador (*primer*) com um grupo hidroxila 3′ livre. Por conseguinte, a síntese de DNA é iniciada pela síntese de um RNA *primer*, a tarefa de uma enzima primase especializada. Após atuar como *primer*, o RNA é degradado e substituído por DNA. As DNA polimerases sempre sintetizam uma fita de DNA no sentido de 5′ para 3′. Para que ambas as fitas da dupla-hélice possam ser sintetizadas simultaneamente na mesma direção, uma fita é sintetizada de modo contínuo, enquanto a outra é sintetizada em fragmentos, denominados fragmentos de Okazaki. Os espaços entre os fragmentos são selados por DNA ligases. As helicases acionadas por ATP preparam o caminho para a replicação do DNA, separando as fitas da dupla-hélice.

28.2 O desenrolamento e o superespiralamento do DNA são controlados por topoisomerases

Uma propriedade topológica essencial do DNA é o seu número de ligação (*Lk*), definido pelo número de vezes que uma fita DNA se enrola ao redor da outra para a direita, quando o eixo do DNA é mantido em um plano. As moléculas que diferem no número de ligação são topoisômeros

um do outro e só podem sofrer interconversão cortando uma ou ambas as fitas de DNA. Essas reações são catalisadas por topoisomerases. Em geral, alterações no número de ligação geralmente levam a mudanças no número de voltas da dupla-hélice e no número de voltas da super-hélice. A topoisomerase II catalisa a introdução impulsionada por ATP de superespirais negativas, levando à compactação do DNA e tornando-o mais suscetível ao desenrolamento. O DNA superespiralado pode ser relaxado pela topoisomerase I ou topoisomerase II. A topoisomerase I atua ao clivar transitoriamente uma fita de DNA na dupla-hélice, enquanto a topoisomerase II cliva transitoriamente ambas as fitas de modo simultâneo.

28.3 A replicação do DNA é altamente coordenada

As DNA polimerases de replicação são processivas, isto é, catalisam a adição de muitos nucleotídios sem se dissociar do molde. Um importante fator contribuinte para a processividade é o grampo deslizante de DNA, como a subunidade β dimérica da polimerase de replicação de *E. coli*. O grampo de deslizamento tem uma estrutura em anel que circunda a dupla-hélice de DNA e mantém a enzima e o DNA associados. A holoenzima da DNA polimerase é uma grande máquina de cópia de DNA formada por duas enzimas de DNA polimerase, uma para atuar em cada fita-molde, associada a outras subunidades, incluindo um grampo de deslizamento e um aplicador de grampo.

A síntese da fita condutora e da fita defasada de um molde de DNA de dupla fita é coordenada. À medida que uma polimerase de replicação se move ao longo de um molde de DNA, a fita condutora é copiada de modo contínuo, enquanto a fita defasada forma alças que mudam de tamanho durante a síntese de cada fragmento de Okazaki. O modo de ação é designado como modelo em trombone.

A replicação do DNA é iniciada em um único sítio no genoma de *E. coli*. Um conjunto de proteínas específicas reconhece essa origem de replicação e monta as enzimas necessárias para a síntese de DNA, incluindo uma helicase que promove a separação das fitas. A iniciação da replicação nos eucariotos é mais complexa. A síntese de DNA é iniciada em milhares de sítios por todo o genoma. Montagens homólogas àquelas de *E. coli*, porém mais complicadas, são efetuadas em cada origem de replicação eucariótica. Uma polimerase especial, denominada telomerase, que depende de um molde de RNA, sintetiza estruturas especializadas, denominadas telômeros, nas extremidades de cromossomos lineares.

28.4 Muitos tipos de dano ao DNA podem ser reparados

Pode ocorrer uma ampla variedade de danos ao DNA. Por exemplo, bases pareadas inadequadamente podem ser incorporadas durante a replicação do DNA, ou bases individuais podem ser lesadas por oxidação ou alquilação após a replicação do DNA. Outras formas de dano incluem a formação de ligações cruzadas e a introdução de quebras de fita simples ou fita dupla no arcabouço do DNA. Vários sistemas de reparo diferentes detectam e procedem ao reparo de lesões do DNA. O reparo começa com o processo de revisão na replicação do DNA: as bases de pareamento incorreto que foram incorporadas durante a síntese são excisadas pela atividade de exonuclease presente nas polimerases de replicação. Algumas lesões do DNA, como dímeros de timina, podem ser diretamente revertidas pela ação de enzimas específicas. Outras vias de reparo do DNA atuam por meio da excisão de bases únicas danificadas (reparo

por excisão de bases) ou curtos segmentos de nucleotídios (reparo por excisão de nucleotídios). Processos de junção de extremidades homólogas ou não homólogas podem proceder ao reparo de quebras de fitas duplas no DNA. Os defeitos nos componentes de reparo do DNA estão associados a uma suscetibilidade a muitos tipos diferentes de câncer. Esses defeitos constituem um alvo comum dos tratamentos para o câncer. Muitos carcinógenos potenciais podem ser detectados pela sua ação mutagênica em bactérias (teste de Ames).

28.5 A recombinação do DNA desempenha papéis importantes na replicação, no reparo e em outros processos

A recombinação é a troca de segmentos entre duas moléculas de DNA. Ela é importante em alguns tipos de reparo de DNA, bem como em outros processos, como a meiose, a produção de diversidade de anticorpos e os ciclos de vida de alguns vírus. Algumas vias de recombinação são iniciadas por invasão de fitas, em que uma única fita na extremidade de uma dupla-hélice de DNA forma pares de bases com uma fita de DNA de outra dupla-hélice, deslocando a outra fita. Um intermediário comum formado em outras vias de recombinação é a junção de Holliday, que consiste em quatro fitas de DNA que se reúnem para formar uma estrutura semelhante a uma cruz. As recombinases promovem reações pela introdução de quebras específicas de DNA e formação e resolução de intermediários da junção de Holliday.

Palavras-chave

ciclo celular (p. 842)
complexo de origem de replicação (ORC) (p. 841)
contorção (p. 832)
DNA ligase (p. 830)
DNA polimerase (p. 826)
exonuclease (p. 827)
fita condutora (p. 830)
fita defasada (p. 830)
forquilha de replicação (p. 829)
fragmento de Okazaki (p. 829)
gene supressor de tumores (p. 848)
grampo de deslizamento (p. 838)
helicase (p. 830)
iniciador (*primer*) (p. 827)
junção de extremidades não homólogas (NHEJ) (p. 847)
junção de Holliday (p. 851)
modelo em trombone (p. 839)
molde (p. 826)
mutagênico (p. 843)
número de ligação (p. 832)
origem de replicação (p. 840)
primase (p. 829)
processividade (p. 837)
RecA (p. 851)

recombinase (p. 851)
reparo de pareamento impróprio (p. 846)
reparo direto (p. 846)
reparo por excisão de bases (p. 846)
reparo por excisão de nucleotídios (p. 846)
repetição de trinucleotídios (p. 848)
sinapse de recombinação (p. 852)
superespiralamento (p. 832)
telomerase (p. 843)
telômero (p. 842)
teste de Ames (p. 849)
topoisomerase (p. 834)
topoisômero (p. 832)
torção (p. 832)

Questões

1. *Intermediários ativados*. A DNA polimerase I, a DNA ligase e a topoisomerase I catalisam a formação de ligações fosfodiéster. Qual é o intermediário ativado na reação de ligação catalisada por cada uma dessas enzimas? Qual é o grupo que sai?

2. *A vida em uma banheira de água quente*. Uma *Archaea* (*Sulfolobus acidocaldarius*), encontrada em fontes termais ácidas, contém uma topoisomerase que catalisa a introdução, acionada pelo ATP, de superespirais positivas no DNA. Como essa enzima poderia ser vantajosa para esse microrganismo incomum?

3. *Que caminho?* Forneça uma explicação química para a síntese de DNA na direção 5′ para 3′.

4. *Necessidade de nucleotídios*. A replicação do DNA não ocorre na ausência de ribonucleotídios ATP, CTP, GTP e UTP. Proponha uma explicação.

5. *Contato íntimo*. O exame da estrutura das DNA polimerases ligadas a análogos de nucleotídios revela que os resíduos conservados entram em contato C-2 via interações de van der Waals do nucleotídio ligado. Qual é a potencial importância dessa interação?

6. *Motores moleculares na replicação*. (a) Com que velocidade o molde de DNA gira (em revoluções por segundo) na forquilha de replicação de *E. coli*? (b) Qual é a velocidade do movimento (em micrômetros por segundo) da holoenzima da DNA polimerase III em relação ao molde?

7. *Mais enrolado do que um carretel*. Por que a replicação seria interrompida na ausência de topoisomerase II?

8. *A ligação ausente*. Uma forma de plasmídio exibe um giro de $Tw = 48$ e uma torção de $Wr = 3$. Qual o número de ligação? Qual seria o valor da torção para uma forma com giro $Tw = 50$, se o número de ligação é o mesmo que a forma precedente.

9. *Telômeros e câncer*. A telomerase não é ativa na maioria das células humanas. Alguns biólogos do

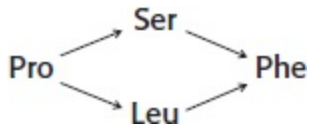
câncer sugeriram que a ativação do gene da telomerase seria um requisito para que uma célula se torne cancerosa. Explique por que isso pode ser verdadeiro.

10. *Invertido?* A helicase do bacteriófago T7 move-se ao longo do DNA na direção 5′ para 3′. Foi relatado que outras helicases movem-se na direção 3′ para 5′. Existe alguma razão fundamental para esperar que as helicases se movam em uma direção ou outra?

11. *Transferência de corte (nick translation)*. Suponha que você queira obter uma amostra de DNA dúplex altamente radioativo para usar como sonda de DNA. Você dispõe de uma DNA endonuclease que cliva internamente o DNA, produzindo os grupos OH 3′ e fosforila 5′, DNA polimerase I intacta e dNTP radioativos. Sugira um modo de tornar o DNA radioativo.

12. *Pistas reveladoras*. Suponha que a replicação seja iniciada em um meio contendo timidina tritiada *moderadamente* radioativa. Depois de alguns minutos de incubação, as bactérias são transferidas para um meio contendo timidina tritiada *altamente* radioativa. Esquematize o padrão autorradiográfico que você veria para (a) a replicação unidirecional e (b) a replicação bidirecional, cada uma delas a partir de uma única origem.

13. *Rastro mutagênico*. Suponha que o RNA de fita simples do vírus do mosaico do tabaco tenha sido tratado com um agente mutagênico químico, que tenham sido obtidos mutantes com serina ou leucina, em lugar de prolina, em uma posição específica, e que o tratamento subsequente desses mutantes com o mesmo agente mutagênico tenha produzido fenilalanina nessa posição.



(a) Quais os possíveis códons para esses quatro aminoácidos?

(b) O agente mutagênico era 5-bromouracila, ácido nitroso ou corante de acridina?

14. *Espectro induzido*. As DNA fotoliases convertem a energia luminosa na região próxima a ultravioleta ou visível do espectro (300 a 500 nm) em energia química para quebrar o anel de ciclobutano de dímeros de pirimidina. Na ausência de substrato, essas enzimas fotorreativadoras não absorvem luz de comprimentos de onda superiores a 300 nm. Por que a faixa de absorção induzida por substrato é vantajosa?

15. *Telomerase ausente*. As células que carecem de telomerase podem crescer durante várias divisões celulares, sem quaisquer efeitos óbvios. Entretanto, depois de mais divisões celulares, essas células tendem a exibir cromossomos que se fundiram. Proponha uma explicação para a formação dos cromossomos.

16. *Preciso me desprender*. Partindo do pressuposto de que a energia necessária para romper um par de bases no DNA seja de 10 kJ mol^{-1} (2,4 kcal mol^{-1}), calcule o número máximo de pares de bases que poderiam ser rompidos por ATP hidrolisado pela ação de uma helicase operando em condições padrões.

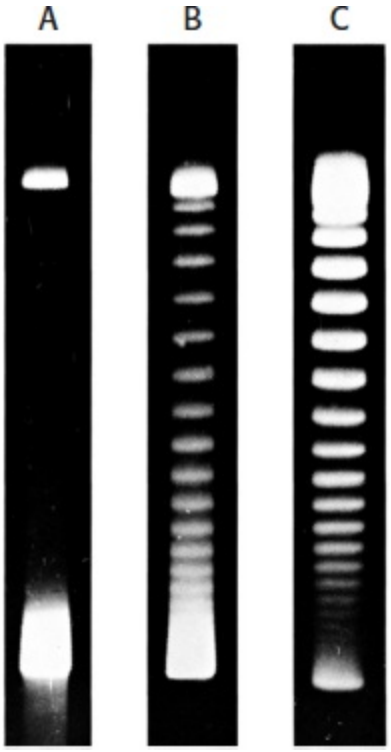
17. *Oxidação de tripletes*. A oxidação de bases de guanina no contexto de repetições de tripletes, como CAGCAGCAG, pode levar à expansão da repetição. Explique.

Questão sobre mecanismo

18. *Um análogo revelador*. O AMP-PNP o análogo β,γ-imida do ATP (p. 831), é hidrolisado muito lentamente pela maioria das ATPases. A adição de AMP-PNP à topoisomerase II e ao DNA circular leva à formação do superespiralamento negativo de uma única molécula de DNA por enzima. O DNA permanece ligado à enzima na presença desse análogo. O que esse achado revela acerca do mecanismo catalítico da enzima?

Questões Integração de capítulos e interpretação de dados

19. *Como uma escada de mão*. O DNA circular do vírus SV40 foi isolado e submetido a eletroforese em gel. Os resultados são mostrados na coluna A (controle) dos padrões de gel anexos.



[De W. Keller. *PNAS* 72: 2553, 1975.]

(a) Por que o DNA se separa na eletroforese em gel de agarose? Como o DNA difere em cada faixa?

O DNA foi então incubado com topoisomerase I durante 5 min e novamente analisado por eletroforese em gel, com os resultados mostrados na coluna B.

(b) Que tipos de DNA as várias faixas representam?

Outra amostra de DNA foi incubada com topoisomerase I durante 30 min e novamente analisada, como mostra a coluna C.

(c) Qual o significado do fato de que a maior parte do DNA se encontra em formas de movimento mais lento?

20. *Teste de Ames*. A ilustração a seguir mostra quatro placas de Petri usadas para o teste de Ames. Um pedaço de papel de filtro (círculo branco no centro de cada placa) foi embebido em uma de quatro preparações e, em seguida, colocado em uma placa de Petri. As quatro preparações continham

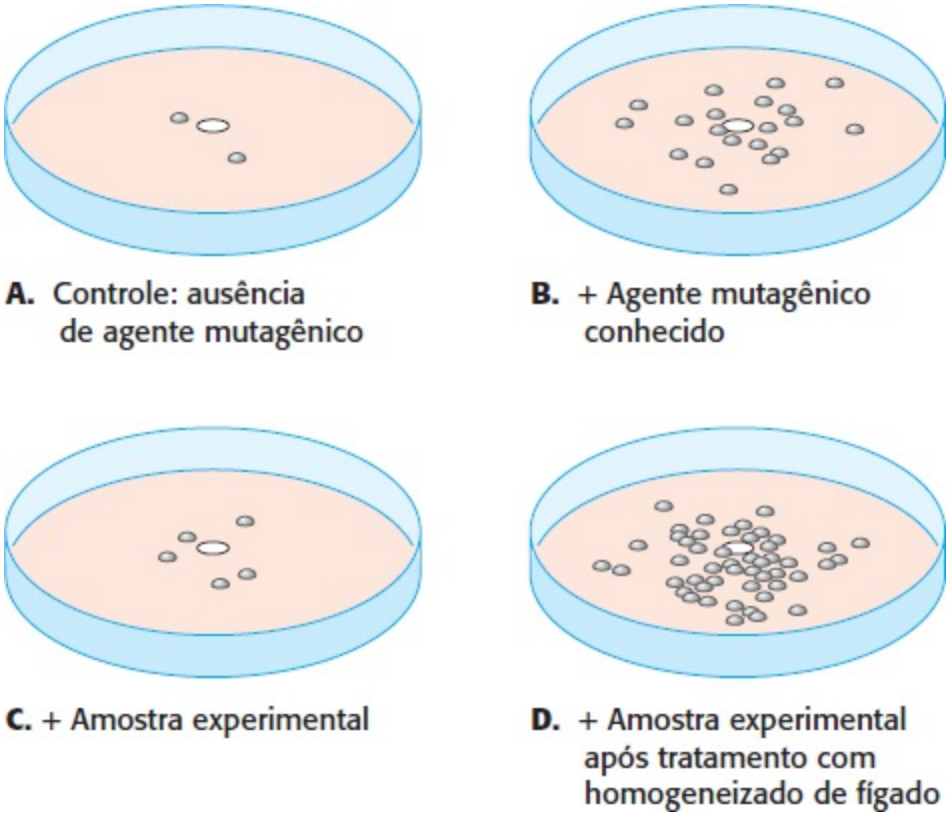
(A) água purificada (controle), (B) um agente mutagênico conhecido, (C) uma substância química cuja mutagenicidade está sendo investigada, e (D) a mesma substância química após tratamento com homogeneizado de fígado. Em cada caso, foi determinado o número de revertentes visíveis como colônias nas placas de Petri.

(a) Qual foi a finalidade da placa de controle, que foi exposta apenas à água?

(b) Por que é recomendável usar um agente mutagênico conhecido no sistema experimental?

(c) Como você interpretaria os resultados obtidos com o composto experimental?

(d) Que componentes do fígado você acredita que sejam responsáveis pelos efeitos observados na preparação D?

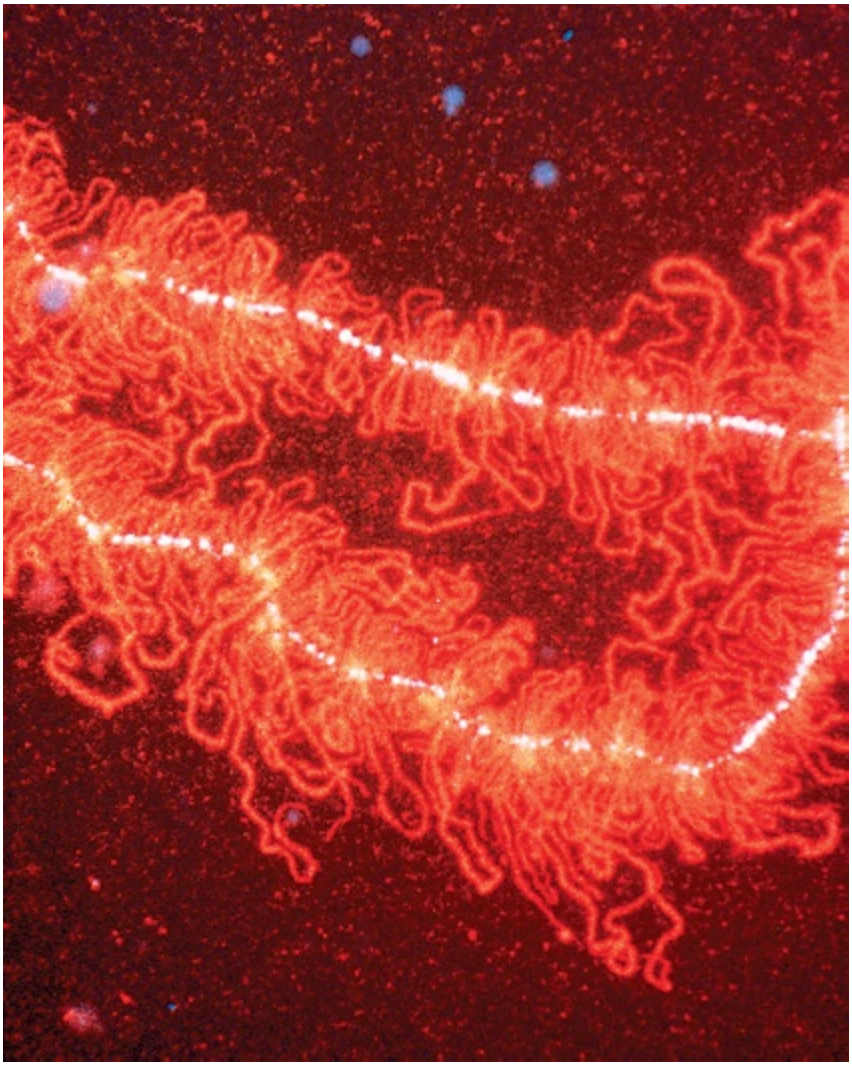


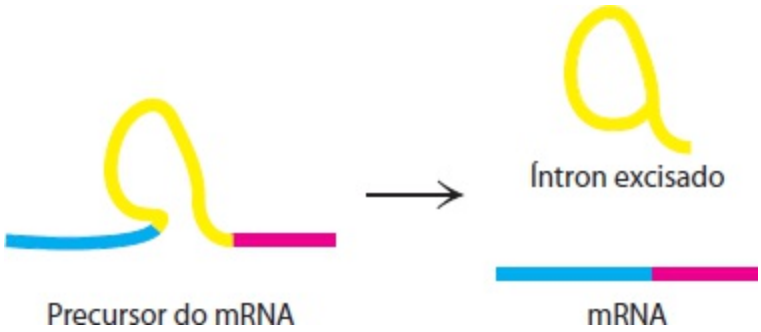
A. Controle: ausência de agente mutagênico

B. + Agente mutagênico conhecido

C. + Amostra experimental

D. + Amostra experimental após tratamento com homogeneizado de fígado





A síntese de RNA constitui uma etapa essencial na expressão da informação genética. Para as células eucarióticas, o RNA transcrito inicial (o precursor do mRNA) frequentemente sofre *splicing*, removendo íntrons que não codificam sequências de proteínas. Em geral, o mesmo pré-mRNA sofre *splicing* diferente em tipos distintos de células ou em diferentes estágios do desenvolvimento. Na imagem à esquerda, proteínas associadas ao *splicing* do RNA (coradas com um anticorpo fluorescente) destacam as regiões do genoma do tritão que estão sendo ativamente transcritas. [Imagem à esquerda, cortesia do Dr. Mark B. Roth e do Dr. Joseph G. Gall.]

SUMÁRIO

29.1 As RNA polimerases catalisam a transcrição

29.2 A transcrição nos eucariotos é altamente regulada

29.3 Os produtos de transcrição das polimerases eucarióticas são processados

29.4 A descoberta do RNA catalítico foi reveladora em relação ao mecanismo e à evolução

O DNA armazena a informação genética de modo estável, passível de ser prontamente replicado. A expressão dessa informação genética exige que o seu fluxo ocorra do DNA para o RNA e, habitualmente, para a proteína, como foi documentado no Capítulo 4. Este capítulo irá examinar a síntese ou *transcrição* do RNA, que consiste no processo de síntese de um transcrito de RNA com transferência da informação das sequências a partir de um molde de DNA. Começaremos com uma discussão das RNA polimerases, as grandes e complexas enzimas que realizam o processo de síntese. Em seguida, trataremos da transcrição nas bactérias e abordaremos os três estágios da transcrição: ligação ao promotor e iniciação; alongamento do transcrito de RNA nascente; e término. Em seguida, examinaremos a transcrição nos eucariotos, enfatizando as distinções entre a transcrição nas bactérias e nos eucariotos.

Os transcritos de RNA nos eucariotos são extensamente modificados, conforme exemplificado pela adição de um cap (*capping*) na extremidade 5′ de um precursor de mRNA e pela adição de uma longa cauda poli(A) em sua extremidade 3′. Um dos exemplos mais notáveis de modificação do RNA é o *splicing* de precursores de mRNA, que é catalisado por spliceossomos, isto é, complexos proteicos constituídos de partículas de ribonucleoproteínas nucleares pequenas (snRNP, *do inglês small nuclear ribonucleoprotein particles*). De modo notável, algumas moléculas de RNA podem sofrer *splicing* por elas próprias na ausência de proteína. Essa importante descoberta feita por Thomas Cech e Sidney Altman revelou que as moléculas de RNA podem servir como catalisadores e influenciou acentuadamente a nossa visão da evolução molecular.

O *splicing* do RNA não é uma mera curiosidade. Pelo menos 15% de todas as doenças genéticas têm sido associadas a mutações que afetam o *splicing* do RNA. Além disso, o mesmo pré-mRNA pode sofrer *splicing* diferente em vários tipos de células, em diferentes estágios do desenvolvimento ou em resposta a outros sinais biológicos. Também, bases individuais em algumas moléculas de pré-mRNA são modificadas, em um processo denominado *edição do RNA*. Uma das maiores surpresas do sequenciamento do genoma humano foi que apenas cerca de 23.000 genes foram identificados, em comparação com estimativas prévias de 100.000 ou mais. A capacidade de um gene de codificar mais de um mRNA distinto por *splicing* alternativo, e, portanto, mais de uma proteína, pode desempenhar um papel essencial na expansão do repertório de nossos genomas.

A síntese de RNA compreende três estágios: iniciação, alongamento e término

A síntese de RNA é catalisada por grandes enzimas, denominadas *RNA polimerases*. A bioquímica básica da síntese de RNA é comum a todos os organismos, uma comunalidade que foi muito bem ilustrada pelas estruturas tridimensionais de RNA polimerases representativas de bactérias e eucariotos (Figura 29.1). A despeito de diferenças substanciais no tamanho e no número de subunidades polipeptídicas, as estruturas globais dessas enzimas são muito semelhantes, revelando

uma origem evolutiva comum.

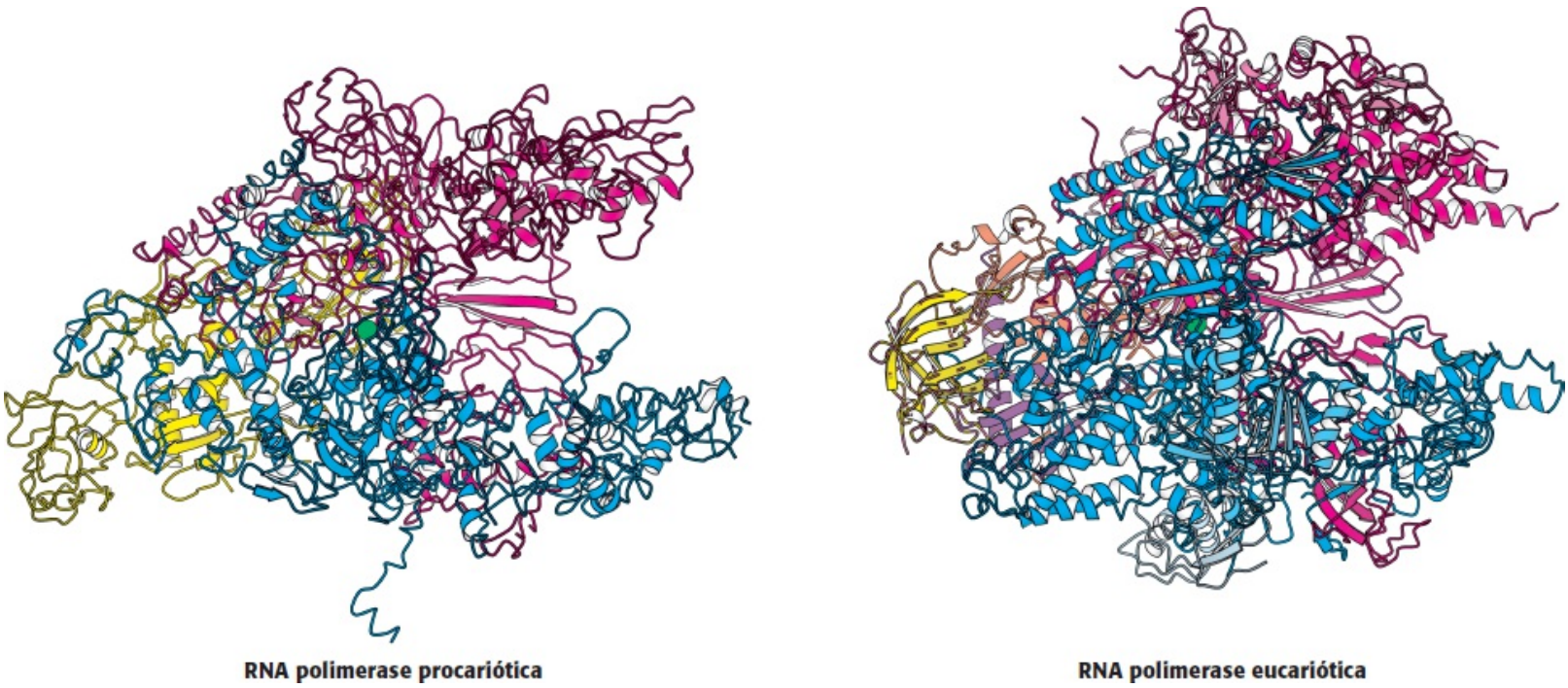


Figura 29.1 Estruturas da RNA polimerase. Estruturas tridimensionais das RNA polimerases de uma bactéria (*Thermus aquaticus*) e de um eucarioto (*Saccharomyces cerevisiae*). As duas subunidades maiores de cada estrutura são mostradas em vermelho-escuro e azul-escuro. *Observe* que ambas as estruturas contêm um íon metálico central (verde) nos sítios ativos, próximo a uma grande fenda à direita. A semelhança dessas estruturas revela que essas enzimas apresentam a mesma origem evolutiva e exibem muitas características de mecanismo em comum. [Desenhada a partir de 1I6V.pdb e 1I6H.pdb.]

A síntese de RNA, à semelhança de todas as reações biológicas de polimerização, ocorre em três estágios: *iniciação, alongamento e término*. As RNA polimerases desempenham múltiplas funções nesse processo:

1. Elas rastreiam o DNA à procura de sítios de iniciação, também denominados *sítios promotores* ou, simplesmente, *promotores*. Por exemplo, o DNA de *E. coli* tem cerca de 2.000 sítios promotores em seu genoma de $4{,}8 \times 10^6$ pb.

2. Elas desenrolam um curto segmento da dupla-hélice de DNA, produzindo moldes de DNA de fita simples, a partir dos quais a sequência de bases pode ser facilmente lida.

3. Elas selecionam o ribonucleosídio trifosfato correto e catalisam a formação de uma ligação fosfodiéster. Esse processo é repetido muitas vezes à medida que a enzima se move ao longo do molde de DNA. A RNA polimerase é totalmente processiva – um transcrito é sintetizado do início ao fim por uma única molécula de RNA polimerase.

4. Elas detectam sinais de término que especificam o local onde termina um transcrito.

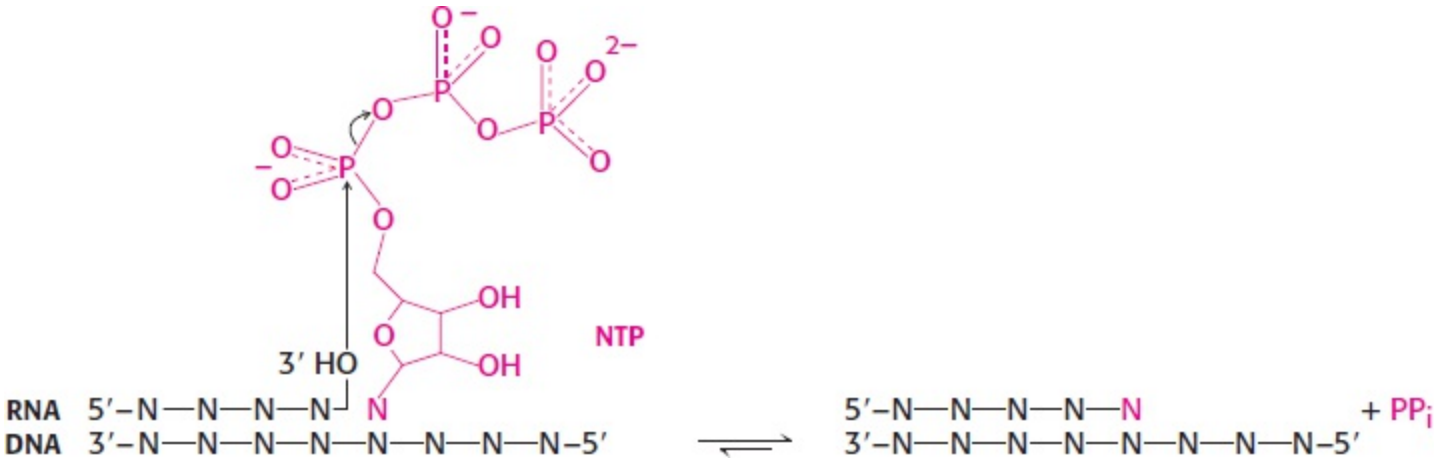
5. Elas interagem com proteínas ativadoras e repressoras, que modulam a taxa de iniciação da transcrição em uma ampla faixa. A expressão gênica é controlada substancialmente no nível da transcrição, conforme discutido de modo detalhado nos Capítulos 31 e 32.

A química da síntese de RNA é idêntica para todas as formas de RNA, incluindo RNA mensageiro, RNA transportador, RNA ribossômico e RNA regulador pequeno. As etapas básicas que acabamos

de delinear aplicam-se a todas as formas. Seus processos de síntese diferem principalmente na regulação, no processamento pós-transcrição e na RNA polimerase específica que participa.

29.1 As RNA polimerases catalisam a transcrição

A reação fundamental da síntese de RNA é a formação de uma ligação fosfodiéster. O grupo hidroxila 3′ do último nucleotídio na cadeia faz um ataque nucleofílico ao grupo α-fosforila do nucleosídio trifosfato que chega, com liberação concomitante de um pirofosfato.



Essa reação é termodinamicamente favorável, e a degradação subsequente do pirofosfato a ortofosfato trava a reação na direção da síntese de RNA. Os sítios catalíticos das RNA polimerases incluem dois íons metálicos, normalmente íons magnésio (Figura 29.2). Um íon permanece firmemente ligado à enzima, enquanto o outro acompanha o nucleosídio trifosfato e sai com o pirofosfato. Três resíduos de aspartato conservados participam na ligação desses íons metálicos.

As RNA polimerases são as enzimas muito grandes e complexas. Por exemplo, a RNA polimerase de *E. coli* consiste em cinco tipos de subunidades, com a composição $\alpha_2\beta\beta'\omega$ (Tabela 29.1). Uma RNA polimerase eucariótica típica é maior e mais complexa, apresentando 12 subunidades e massa molecular total de mais de 0,5 milhão de dáltons. Apesar dessa complexidade, as estruturas das RNA polimerases foram determinadas com detalhes por cristalografia de raios X no trabalho pioneiro de Roger Kornberg e Seth Darst.

As reações de polimerização catalisadas pelas RNA polimerases ocorrem dentro de um complexo no DNA, denominado *bolha de transcrição* (Figura 29.3). Esse complexo consiste em DNA de fita dupla que foi localmente desenrolado em uma região de aproximadamente 17 pares de bases. As bordas das bases que normalmente fazem parte dos pares de bases de Watson-Crick são expostas na região desenrolada. Iniciaremos com uma descrição detalhada do processo de alongamento, incluindo o papel do molde de DNA lido pela RNA polimerase e as reações catalisadas pela polimerase, antes de retornarmos aos processos mais complexos de iniciação e término.

Tabela 29.1 Subunidades da RNA polimerase de *E. coli*.

Subunidade	Gene	Número	Massa (kDa)
α	*rpoA*	2	37

β	*rpoB*	1	151
β′	*rpoC*	1	155
ω	*rpoZ*	1	10
σ^{70}	*rpoD*	1	70

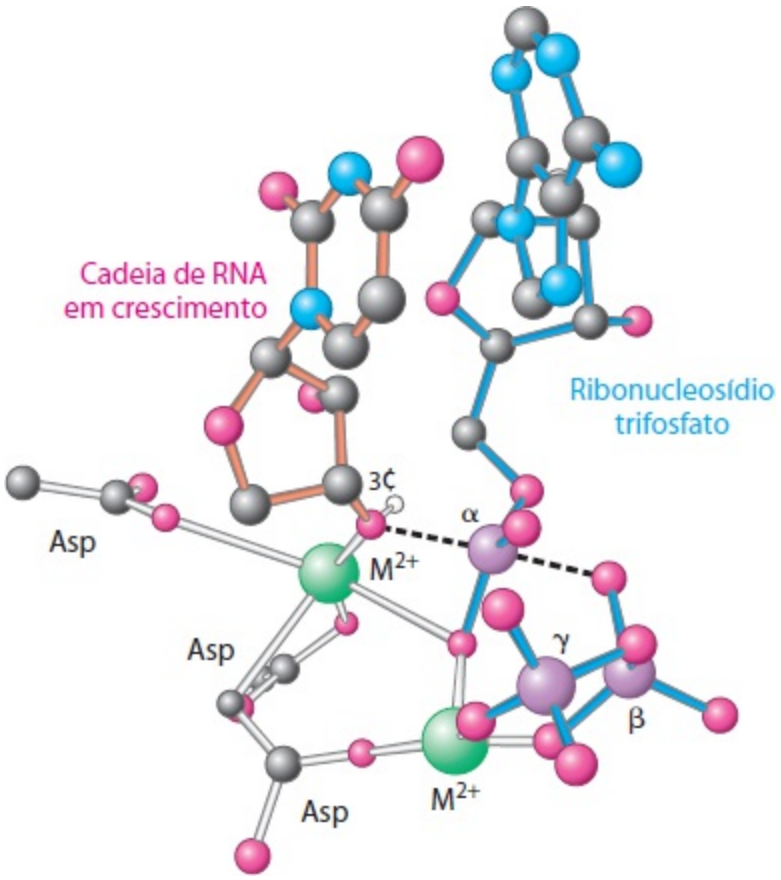


Figura 29.2 Sítio ativo da RNA polimerase. Modelo do estado de transição para a formação de uma ligação fosfodiéster no sítio ativo da RNA polimerase. O grupo 3′-hidroxila da cadeia de RNA em crescimento ataca o grupo α-fosforila do nucleosídio trifosfato que chega, resultando na liberação de pirofosfato. Esse estado de transição assemelha-se, estruturalmente, ao do sítio ativo da DNA polimerase (ver Figura 28.4).

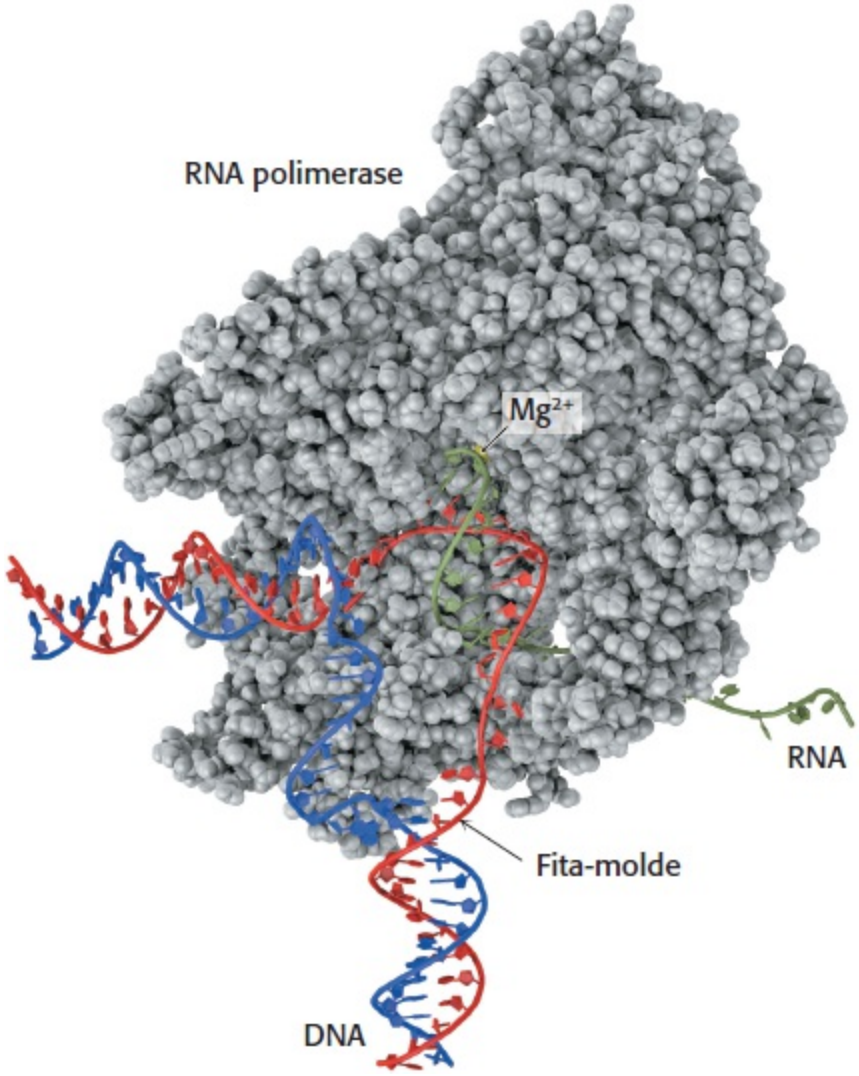


Figura 29.3 Bolha de transcrição. A RNA polimerase separa uma região da dupla-hélice para formar uma estrutura denominada "bolha de transcrição". As fitas em vermelho (fita-molde) e em azul (não molde) de DNA são mostradas juntamente com a molécula de RNA em processo de síntese (mostrada em verde). Está indicada a posição do sítio ativo de magnésio.

As cadeias de RNA são formadas *de novo* e crescem no sentido de 5′ para 3′

Iniciaremos o exame da transcrição ao considerarmos o molde de DNA. O primeiro nucleotídio (sítio de iniciação) de uma sequência de DNA a ser transcrita é indicado como +1, e o segundo, como +2; o nucleotídio que precede o sítio de iniciação é indicado como –1. Essas designações referem-se à fita codificante do DNA. Convém lembrar que a sequência da *fita-molde do DNA* é o *complemento* da fita do RNA transcrito (Figura 29.4). Em contrapartida, a *fita codificante do DNA* tem a *mesma* sequência que o transcrito de RNA, com a exceção da timina (T) em lugar da uracila (U). A fita codificante é também conhecida como *fita senso* (+), e a fita-molde, como *fita antissenso* (–).

Diferentemente da síntese de DNA, a *síntese de RNA pode começar de novo, sem a necessidade de um iniciador (primer)*. As cadeias de RNA recém-sintetizadas transportam, em sua maioria, uma marca altamente distinta na extremidade 5′: a primeira base nessa extremidade é *pppG* ou *pppA*.

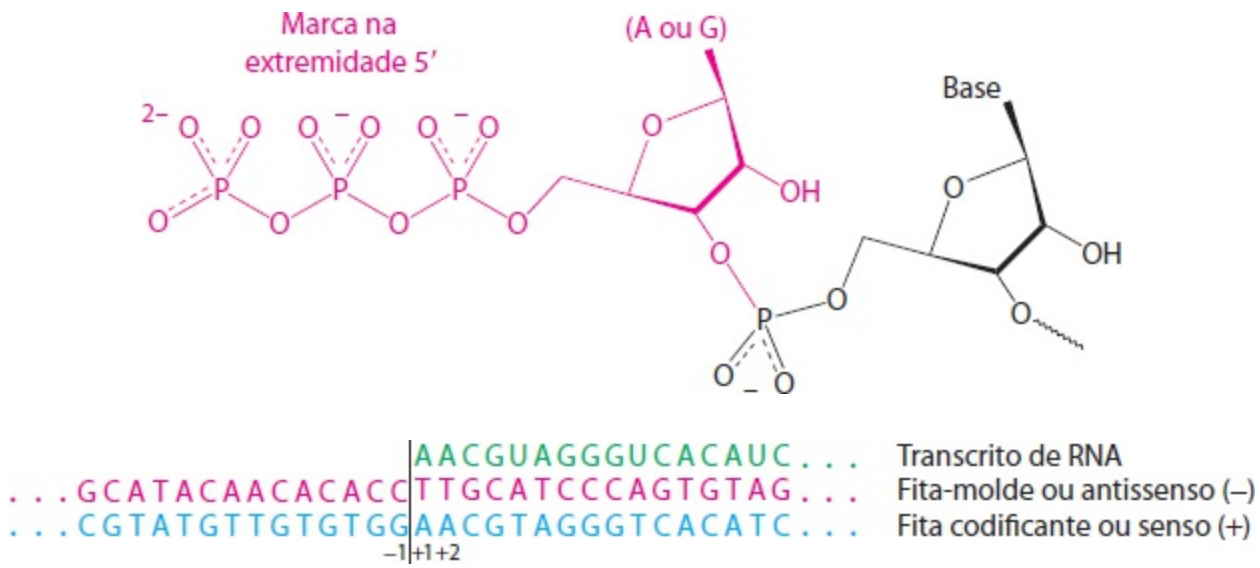


Figura 29.4 Fitas-molde e codificante. A fita-molde ou antissenso (–) é complementar na sua sequência ao transcrito de RNA.

A presença de trifosfato confirma que a síntese de RNA começa na extremidade 5′.

O dinucleotídio mostrado na p. 860 é sintetizado pela RNA polimerase como parte do complexo processo de iniciação, que será discutido posteriormente neste capítulo. Após a ocorrência da iniciação, a RNA polimerase procede ao alongamento da cadeia de ácido nucleico da seguinte maneira (Figura 29.5). Um ribonucleosídio trifosfato liga-se ao sítio ativo da RNA polimerase, em local diretamente adjacente à cadeia de RNA em crescimento. O ribonucleosídio trifosfato que chega forma um par de bases de Watson-Crick com a fita-molde. O grupo hidroxila 3′ da cadeia de RNA em crescimento, orientado e ativado pelo íon metálico firmemente ligado, ataca o grupo α-fosforila para formar uma nova ligação fosfodiéster, deslocando o pirofosfato.

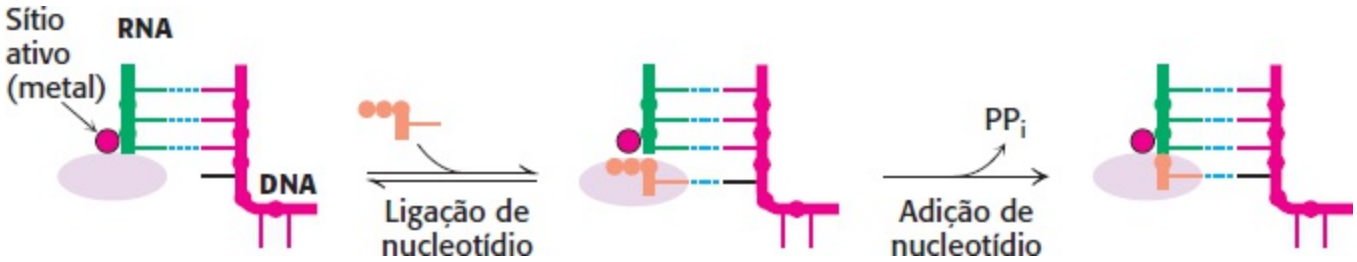


Figura 29.5 Mecanismo de alongamento. Um ribonucleosídio trifosfato liga-se em um local adjacente à cadeia de RNA em crescimento e forma um par de bases de Watson-Crick com uma base na fita-molde de DNA. O grupo hidroxila 3′ na extremidade da cadeia de RNA ataca o nucleotídio recém-ligado e forma uma nova ligação fosfodiéster, liberando pirofosfato.

Para prosseguir na próxima etapa, o híbrido RNA–DNA precisa se mover em relação à polimerase para que a extremidade 3′ do nucleotídio recém-adicionado fique na posição apropriada para a adição do próximo nucleotídio (Figura 29.6). Essa etapa de translocação não inclui a ruptura de nenhuma ligação entre pares de bases e é reversível; todavia, uma vez ocorrida, a adição do próximo nucleotídio, favorecida pela clivagem do trifosfato e liberação e clivagem do pirofosfato, aciona a reação de polimerização.

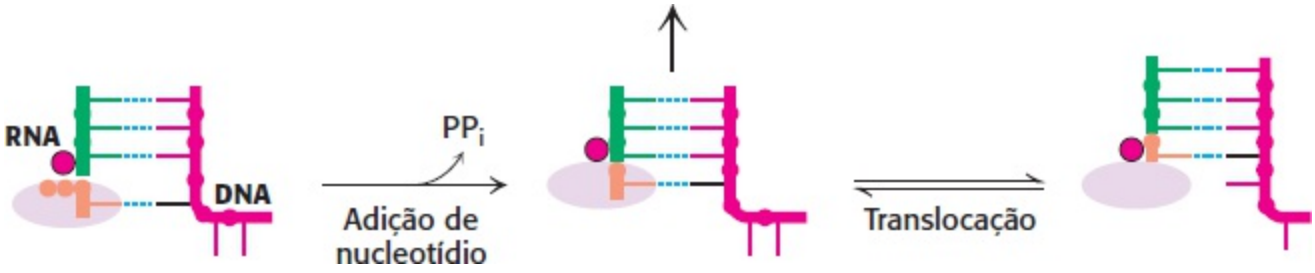


Figura 29.6 Translocação. Após a adição do nucleotídio, o híbrido RNA—DNA pode se translocar pela RNA polimerase, colocando uma nova base de DNA em sua posição para pareamento de bases com a chegada de um nucleosídio trifosfato.

Os comprimentos do híbrido RNA–DNA e da região desenrolada do DNA permanecem bastante constantes à medida que a RNA polimerase se move ao longo do molde de DNA. O comprimento do híbrido RNA–DNA é determinado por uma estrutura dentro da enzima que força o híbrido a se separar, deixando a cadeia de RNA sair da enzima e a cadeia de DNA se unir a seu DNA parceiro (Figura 29.7).

As RNA polimerases retrocedem e corrigem erros

O híbrido RNA-DNA também pode se mover no sentido oposto ao do alongamento (Figura 29.8). Esse retrocesso é, do ponto de vista energético, menos favorável do que o movimento para frente, visto que ele quebra as ligações entre um par de bases. Entretanto, o retrocesso é muito importante para a *revisão*. A incorporação de um nucleotídio incorreto introduz um par de bases não Watson-Crick. Nesse caso, a ruptura das ligações entre esse par de bases e o retrocesso são de menor custo energético. Após o retrocesso da polimerase, a ligação fosfodiéster um par de bases antes da recém-formada está adjacente ao íon metálico no sítio ativo. Nessa posição, uma reação de hidrólise, em que uma molécula de água ataca o fosfato, pode resultar na clivagem da ligação fosfodiéster e na liberação de um dinucleotídio que inclua o nucleotídio incorreto.

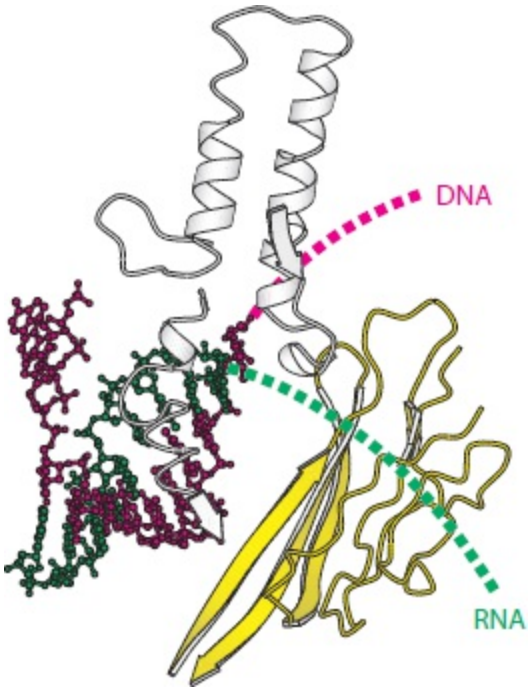


Figura 29.7 Separação do híbrido RNA—DNA. Uma estrutura dentro da RNA polimerase força a separação do híbrido RNA-DNA. *Observe* que a fita de DNA sai em um sentido, enquanto o RNA produzido sai em outro sentido. [Desenhada a partir de 1I6H.pdb.]

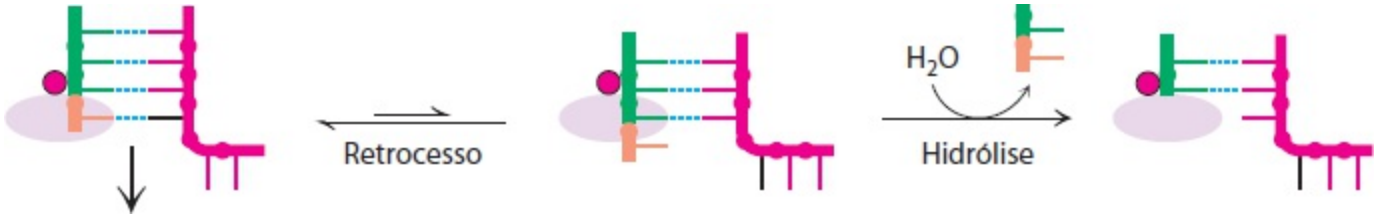


Figura 29.8 Retrocesso. Em certas ocasiões, o híbrido RNA—DNA pode retroceder dentro da RNA polimerase. Na posição de retrocesso, pode ocorrer hidrólise, produzindo uma configuração equivalente àquela depois da translocação. O retrocesso tem mais tendência a ocorrer se for acrescentada uma base incorreta, facilitando a revisão.

Estudos de moléculas isoladas de RNA polimerase confirmaram que as enzimas hesitam e retrocedem para corrigir erros. Além disso, essas atividades de revisão são frequentemente intensificadas por proteínas acessórias. A frequência final de erros, da ordem de um erro por 10^4 ou 10^5 nucleotídios, é mais alta que a da replicação do DNA, incluindo todos os mecanismos de correção de erros. A menor fidelidade associada à síntese de RNA pode ser tolerada, visto que os erros não são transmitidos à progênie. Para a maioria dos genes, muitos transcritos de RNA são sintetizados, e alguns transcritos defeituosos provavelmente não são prejudiciais.

A RNA polimerase liga-se a sítios promotores no molde de DNA para iniciar a transcrição

O processo de alongamento é comum a todos os organismos. Por outro lado, os processos de iniciação e término diferem substancialmente nas bactérias e nos eucariotos. Iniciaremos com uma descrição desses processos em bactérias, começando com o processo de iniciação da transcrição. A RNA polimerase bacteriana discutida anteriormente, com a composição $\alpha_2\beta\beta'\omega$ refere-se ao *cerne da enzima*. A inclusão de uma subunidade adicional produz a *holoenzima*, com composição $\sigma_2\beta\beta'\omega\sigma$. A subunidade σ ajuda a encontrar locais no DNA onde a transcrição começa, denominados *sítios promotores* ou, simplesmente, *promotores*. Nesses locais, a subunidade participa na iniciação da síntese de RNA e, em seguida, dissocia-se do restante da enzima.

As sequências a montante (*upstream*) do sítio promotor são importantes para determinar onde começa a transcrição. Um padrão notável tornou-se evidente quando as sequências de promotores bacterianos foram comparadas. *Dois temas comuns estão presentes a montante do sítio de iniciação da transcrição*. São conhecidos como a *sequência –10* e a *sequência –35*, visto que estão centrados a cerca de 10 e 35 nucleotídios antecedentes ao sítio de iniciação. A região que contém essas sequências é denominada *cerne do promotor*. As sequências –10 e –35 têm, cada uma delas, um comprimento de 6 pb. Suas *sequências de consenso*, deduzidas das análises de muitos promotores (Figura 29.9), são

Figura 29.9 Sequências de promotores bacterianos. Uma comparação de cinco sequências de promotores procarióticos revela uma sequência recorrente de TATAAT centrada na posição –10. A sequência de consenso –10 (em vermelho) foi deduzida de um grande número de sequências de promotores. As sequências são dos óperons (A) *urvD*, (B) *uncI* e (C) *trp* de *E. coli*; de (D) fago λ; e de (E) fago φX174.

Os promotores diferem acentuadamente na sua eficácia. Alguns genes são transcritos com frequência – em uma frequência de até cada 2 s em *E. coli*. Os promotores para esses genes são designados como *promotores fortes*. Em contrapartida, outros genes são transcritos com muito menos frequência, uma vez em 10 min; os promotores desses genes são conhecidos como *promotores fracos*. As regiões –10 e –35 dos promotores mais fortes apresentam sequências que correspondem estreitamente às sequências de consenso, enquanto os promotores fracos tendem a ter múltiplas substituições nesses locais. Com efeito, uma mutação de uma única base na sequência –10 ou sequência –35 pode diminuir a atividade do promotor. A distância entre essas sequências conservadas também é importante, e o ideal é uma separação de 17 nucleotídios. Por conseguinte, *a eficiência ou força de uma sequência promotora serve para regular a transcrição*. As proteínas reguladoras que se ligam a sequências específicas perto dos promotores e que interagem com a RNA polimerase (Capítulo 31) também influenciam acentuadamente a frequência de transcrição de muitos genes.

Fora do cerne do promotor, em um subgrupo de genes altamente expressos, encontra-se o *elemento antecedente* (também denominado elemento UP, de up*stream element)*. Essa sequência está presente 40 a 60 nucleotídios a montante do sítio de iniciação da transcrição. O elemento UP está ligado pela subunidade α da RNA polimerase e serve para aumentar a eficiência da transcrição, criando um local adicional de interação para a polimerase.

As subunidades sigma da RNA polimerase reconhecem os sítios promotores

Para iniciar a transcrição, o cerne $\alpha_2\beta\beta'\omega$ da RNA polimerase deve ligar-se ao promotor. Entretanto, é a *subunidade* σ que possibilita essa ligação, tornando a *RNA polimerase capaz de reconhecer sítios promotores*. Na presença da subunidade σ, a RNA polimerase liga-se fracamente ao DNA e desliza ao longo da dupla-hélice até se dissociar ou encontrar um promotor. A subunidade σ reconhece o promotor mediante várias interações com as bases nucleotídicas do DNA promotor. A estrutura de uma holoenzima RNA polimerase bacteriana ligada a um sítio promotor mostra a interação da subunidade σ com o DNA nas regiões –10 e –35, que são essenciais para o reconhecimento do promotor (Figura 29.10). Por conseguinte, *a subunidade σ é responsável pela ligação específica da RNA polimerase a um promotor no molde de DNA*. Em geral, a subunidade σ é liberada quando a cadeia de RNA nascente alcança um comprimento de 9 ou 10 nucleotídios. Após a

sua liberação, ela pode ajudar na iniciação por outra enzima cerne. Por conseguinte, *a subunidade* σ *atua de modo catalítico*.

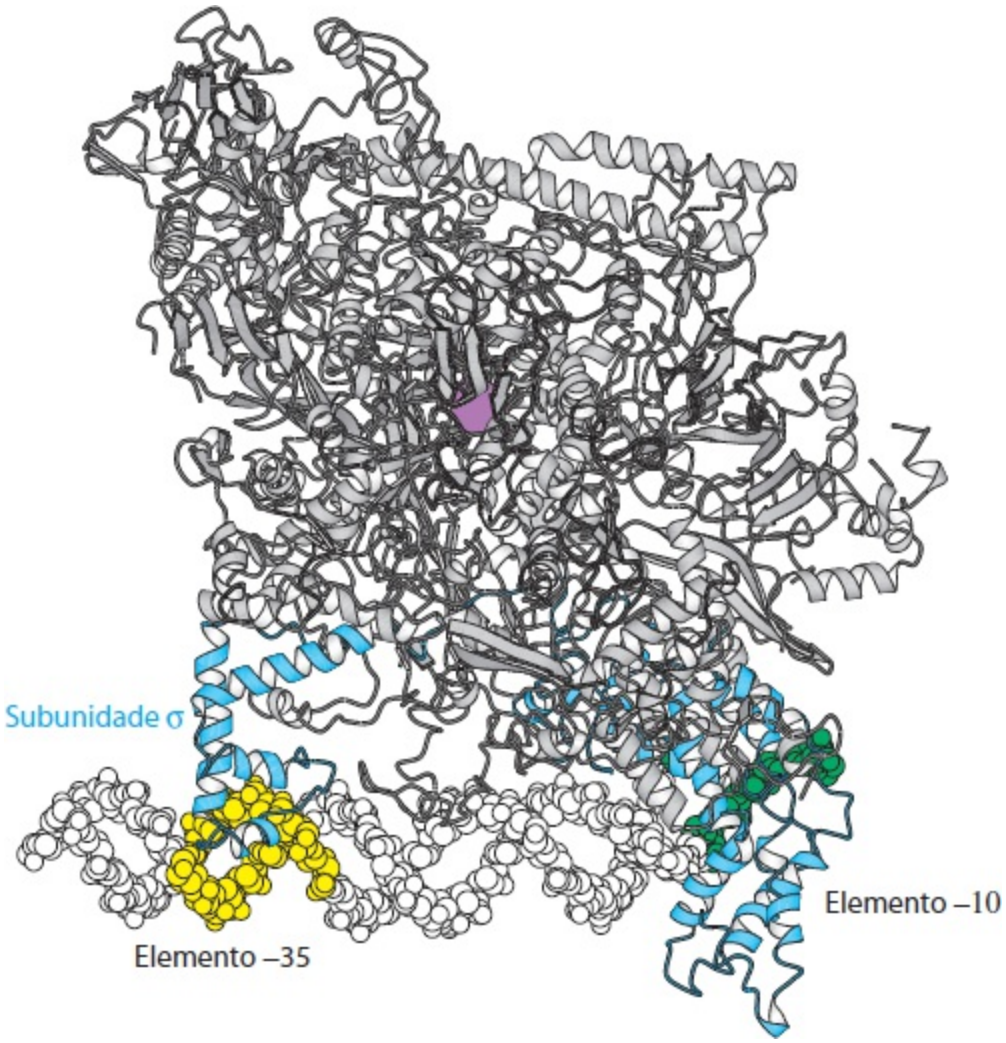


Figura 29.10 Complexo da holoenzima RNA polimerase. *Observe* que a subunidade σ (em azul) da holoenzima RNA polimerase bacteriana estabelece contatos de sequências específicas com os elementos promotores –10 (em verde) e –35 (em amarelo). O sítio ativo da polimerase é revelado pelo íon metálico ligado (em vermelho). [Desenhada a partir de 1L9Z.pdb.]

Figura 29.11 Sequências promotoras alternativas. Uma comparação das sequências de consenso dos promotores padrões, de choque térmico e de privação de nitrogênio de *E. coli*. Esses promotores são reconhecidos, respectivamente, por σ^{70}, σ^{32} e σ^{54}.

A *E. coli* apresenta sete fatores distintos para o reconhecimento de vários tipos de sequências promotoras no DNA de *E. coli*. O tipo que reconhece as sequências de consenso descritas anteriormente é denominado σ^{70}, visto que apresenta massa de 70 kDa. Um fator diferente passa a atuar quando a temperatura é abruptamente elevada. A *E. coli* responde com a síntese de σ^{32}, que reconhece os promotores de *genes de choque térmico*. Esses promotores exibem sequências –10 que são um tanto diferentes da sequência –10 de promotores padrões (Figura 29.11). O aumento da transcrição de genes de choque térmico leva à síntese coordenada de uma série de proteínas

protetoras. Outros fatores respondem a condições ambientais, como a privação de nitrogênio. Esses achados demonstram que *desempenha um papel essencial na determinação do local onde a RNA polimerase inicia a transcrição*.

Algumas outras bactérias contêm um número muito maior de fatores σ. Por exemplo, o genoma da bactéria do solo, *Streptomyces coelicolor*, codifica mais de 60 fatores reconhecidos com base em suas sequências de aminoácidos. Em virtude desse repertório, as células ajustam seus programas de expressão gênica à ampla diversidade de condições relativas a nutrientes e organismos competitivos com as quais podem se defrontar.

As RNA polimerases precisam desenrolar a dupla-hélice do molde para que ocorra a transcrição

Embora as RNA polimerases possam procurar sítios promotores quando ligados ao DNA de dupla-hélice, um segmento desse DNA de dupla-hélice precisa ser desenrolado para que a síntese possa começar. A transição do *complexo promotor fechado* (em que o DNA se encontra na forma de dupla-hélice) para o *complexo promotor aberto* (em que um segmento de DNA está desenrolado) constitui um evento essencial no processo de transcrição (Figura 29.12). A energia livre necessária para romper as ligações entre aproximadamente 17 pares de bases na dupla-hélice provém de interações adicionais que são possíveis quando o DNA se desenrola para envolver a RNA polimerase, bem como de interações entre regiões de DNA de fita simples e outras partes da enzima. Essas interações estabilizam o complexo promotor aberto e ajudam a trazer a fita-molde dentro do sítio ativo. O elemento –35 permanece em um estado de dupla-hélice, enquanto o elemento –10 é desenrolado. O palco agora está preparado para a formação da primeira ligação fosfodiéster da nova cadeia de RNA.

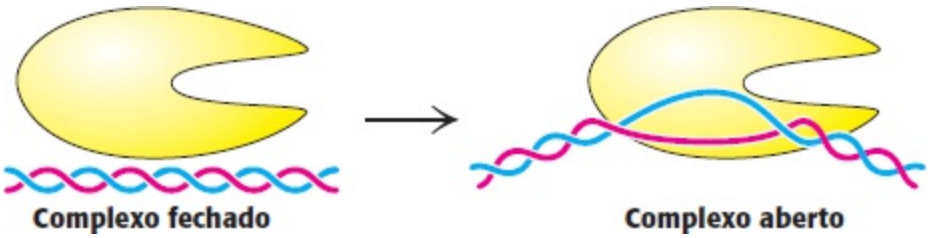


Figura 29.12 Desenrolamento do DNA. A transição do complexo promotor fechado para o aberto requer o desenrolamento de aproximadamente 17 pares de bases do DNA.

O alongamento ocorre em bolhas de transcrição que se movem ao longo do molde de DNA

A fase de alongamento da síntese de RNA começa com a formação da primeira ligação fosfodiéster. Nesse estágio, podem ocorrer ciclos repetidos de adição de nucleotídios. Entretanto, até que cerca de 10 nucleotídios tenham sido adicionados, a RNA polimerase algumas vezes libera o RNA curto, que se dissocia do DNA. Quando a RNA polimerase passa por esse ponto, a enzima fica ligada a seu molde até que seja alcançado um sinal de terminação. A região contendo a RNA polimerase, o DNA e o RNA nascente corresponde à bolha de transcrição (Figura 29.13). O RNA recém-sintetizado forma uma hélice híbrida com a fita-molde de DNA. Essa hélice RNA–DNA tem cerca de 8 pb de comprimento, o que corresponde a quase um giro de uma dupla-hélice. O grupo hidroxila 3′ do RNA

nessa hélice híbrida está posicionado de modo que possa atacar o átomo de fósforo α de um ribonucleosídio trifosfato que chega. O cerne da enzima também contém um sítio de ligação para a fita codificante do DNA. Cerca de 17 pb do DNA são desenrolados durante a fase de alongamento, como na fase de iniciação. A bolha de transcrição move-se a uma distância de 170 Å (17 nm) em um segundo, o que corresponde a uma velocidade de alongamento de cerca de 50 nucleotídios por segundo. Embora rápida, é muito mais lenta do que a velocidade de síntese de DNA, que é de 800 nucleotídios por segundo.

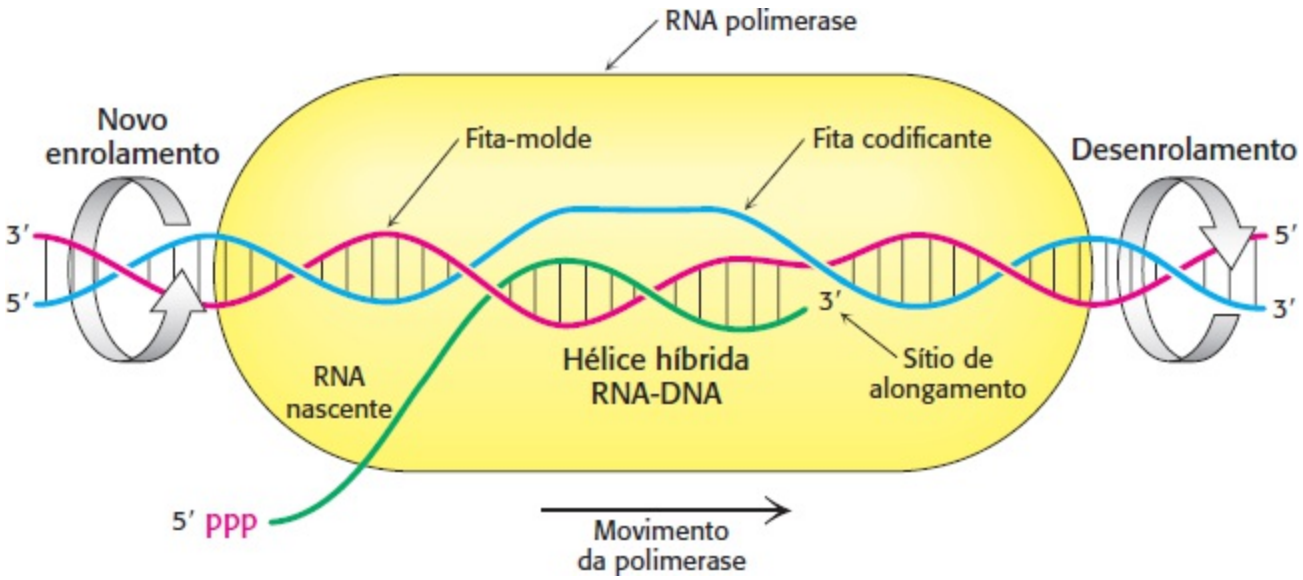


Figura 29.13 Bolha de transcrição. Uma representação esquemática de uma bolha de transcrição no alongamento de um transcrito de RNA. O DNA dúplex é desenrolado na extremidade adiante da RNA polimerase e novamente enrolado na sua extremidade posterior. O híbrido RNA-DNA sofre rotação durante o alongamento.

Sequências dentro do sinal de término do RNA recém-transcrito

Nas bactérias, o término da transcrição é controlado com tanta precisão quanto a sua iniciação. Na fase de término da transcrição, a formação de ligações fosfodiéster cessa, o híbrido RNA-DNA se dissocia, a região desenrolada do DNA volta a se enrolar, e a RNA polimerase libera o DNA. O que determina o local de término da transcrição? *As regiões transcritas dos moldes de DNA contêm sinais de parada*. O mais simples é uma *região palindrômica rica em GC, seguida de uma região rica em AT*. O RNA transcrito desse palíndromo de DNA é autocomplementar (Figura 29.14). Por conseguinte, suas bases podem se emparelhar para formar uma estrutura em grampo de cabelo com uma haste e uma alça, uma estrutura favorecida pelo seu alto conteúdo de resíduos G e C. Os pares de bases guanina-citosina são mais estáveis do que os pares adenina-timina, devido à ponte de hidrogênio extra no par de bases. Esse grampo estável é seguido de uma sequência de quatro ou mais resíduos de uracila, que também são cruciais para o término. O RNA transcrito termina dentro delas ou imediatamente depois.

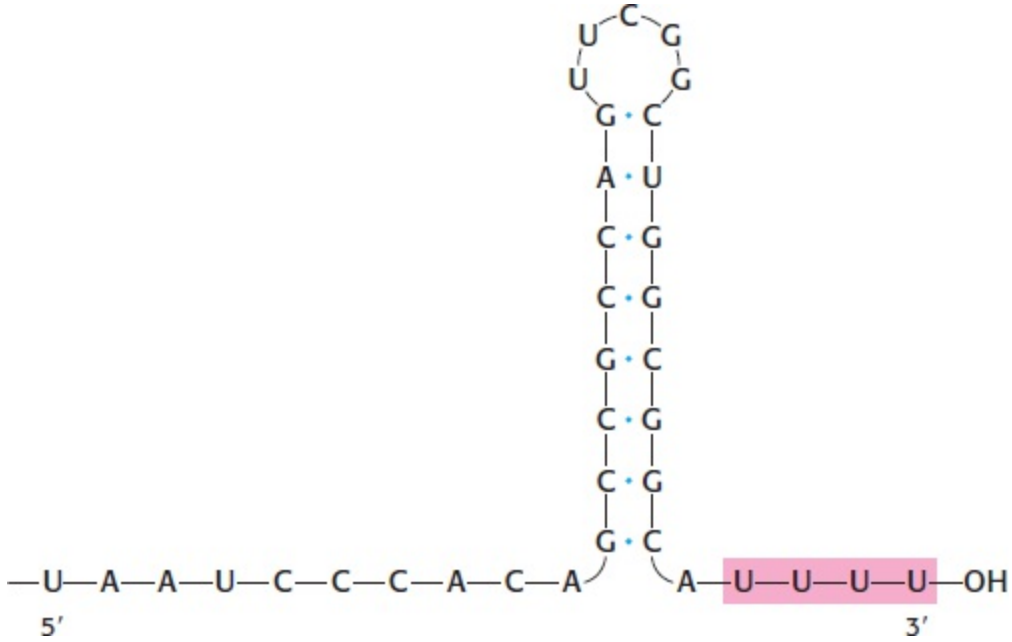


Figura 29.14 Sinal de terminação. Um sinal de término encontrado na extremidade 3′ de um transcrito de mRNA consiste em uma série de bases que formam uma estrutura em haste-alça estável e uma série de resíduos U.

Como essa combinação grampo-estrutura oligo (U) termina a transcrição? Em primeiro lugar, é provável que a RNA polimerase faça uma pausa imediatamente após ter sintetizado um segmento de RNA que se dobra em grampo. Além disso, a hélice híbrida RNA–DNA produzida depois do grampo é instável, visto que seus pares de bases rU-dA são os mais fracos dos quatro tipos. Assim, a pausa na transcrição ocasionada pelo grampo faz com que o *RNA nascente* fracamente ligado *se dissocie do molde de DNA e, em seguida, da enzima*. A fita-molde solitária do DNA volta a se juntar a seu parceiro para reconstituir o dúplex de DNA, e a bolha de transcrição se fecha.

Alguns RNA mensageiros percebem diretamente as concentrações de metabólitos

Como discutiremos detalhadamente nos Capítulos 31 e 32, a expressão de muitos genes é controlada em resposta às concentrações de metabólitos e moléculas sinalizadoras dentro das células. Um conjunto de mecanismos de controle depende da notável capacidade de algumas moléculas de mRNA de formar estruturas secundárias especiais, algumas das quais são capazes de ligar-se diretamente a pequenas moléculas. Essas estruturas são denominadas *riboswitches*. Consideremos um *riboswitch* que controla a síntese de genes que participam na biossíntese de riboflavina (p. 445) de *Bacillus subtilis* (Figura 29.15). Quando a flavina mononucleotídio (FMN), um intermediário essencial na biossíntese de riboflavina, está presente em altas concentrações, ela se liga a uma conformação do transcrito de RNA com uma bolsa de ligação de FMN que também inclui uma estrutura em grampo que favorece o término prematuro. Ao reter o transcrito de RNA nessa conformação que favorece o término, a FMN impede a produção de mRNA funcional. Entretanto, quando presente em baixas concentrações, a FMN não se liga prontamente ao RNA, e uma conformação alternativa é produzida sem o terminador, possibilitando a produção do mRNA de comprimento total. A ocorrência de *riboswitches* fornece uma vívida ilustração de como os RNA são capazes de formar estruturas funcionais e elaboradas, embora a tendência seja mostra-los como simples linhas na ausência de informação específica.

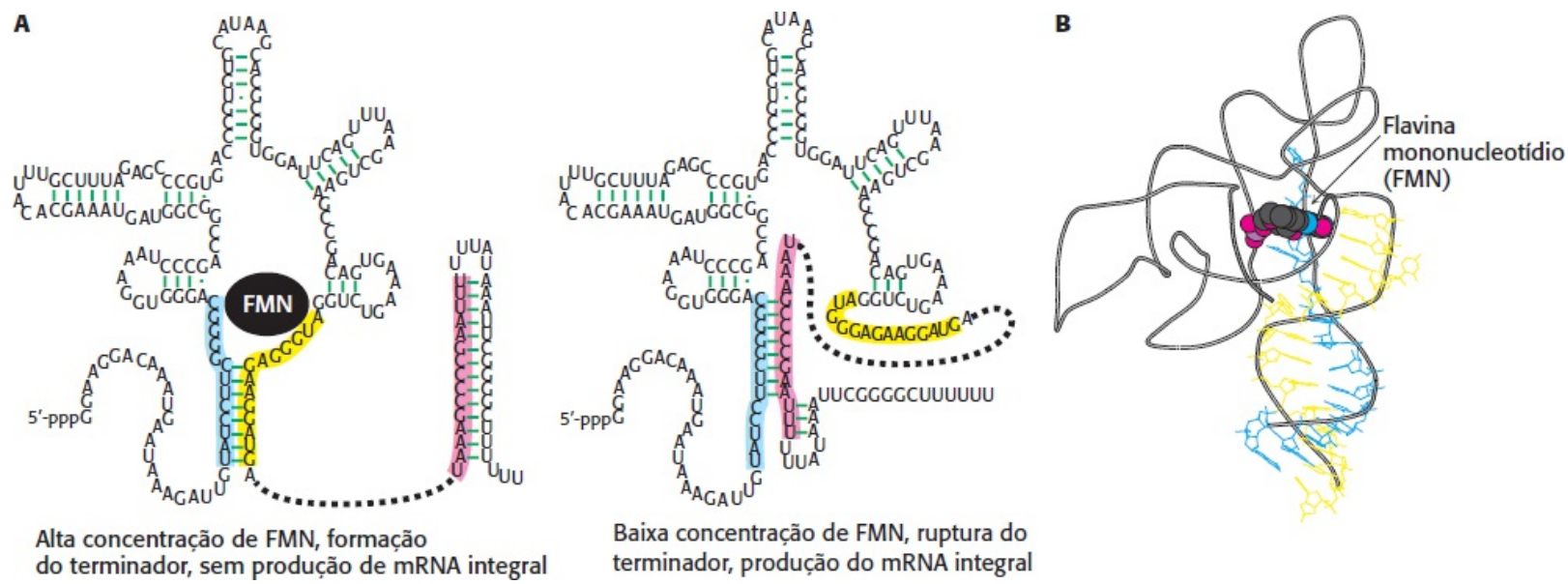


Figura 29.15 ***Riboswitch.*** **A**. A extremidade 5′ de um mRNA que codifica proteínas direcionadas para a produção de flavina mononucleotídio (FMN) dobra-se para formar uma estrutura que é estabilizada pela ligação da FMN. Essa estrutura inclui um terminador que provoca o término prematuro do mRNA. Na presença de concentrações mais baixas de FMN, forma-se uma estrutura alternativa que carece do terminador, levando à produção de mRNA de comprimento integral. **B**. A estrutura tridimensional de um *riboswitch* de ligação ao FMN, ligado ao FMN. Os segmentos azul e amarelo correspondem às regiões indicadas nas mesmas cores na parte A. *Observe* como a fita amarela entra em contato com a FMN ligada, estabilizando a estrutura. [Desenhada a partir de 3F2Q.pdb.]

A proteína *rho* ajuda a terminar a transcrição de alguns genes

A RNA polimerase não precisa de ajuda para terminar a transcrição em um grampo seguido de vários resíduos U. Entretanto, em outros locais, o término requer a participação de um fator adicional. Essa descoberta foi obtida com a observação de que algumas moléculas de RNA sintetizadas *in vitro* pela RNA polimerase atuando sozinha são *mais longas* do que aquelas sintetizadas *in vivo*. O fator ausente, uma proteína que causa o término correto, foi isolado e denominado *rho* (ρ). Informações adicionais sobre a ação do fator foram obtidas pela adição desse fator de término a uma mistura de incubação em vários momentos após o início da síntese de RNA (Figura 29.16). Foram obtidos RNA com coeficientes de sedimentação de 10S, 13S e 17S quando o fator foi acrescentado no início, alguns segundos depois do início e 2 min depois, respectivamente. Quando não foi adicionado nenhum fator ρ, a transcrição gerou um produto de RNA 23S. É evidente que o molde contém pelo menos três sítios de término que respondem ao (produzindo RNA 10S, 13S e 17S) e um sítio de término que não responde (produzindo RNA 23S). Por conseguinte, o término específico em um sítio que produz RNA 23S pode ocorrer na ausência do fator ρ. Entretanto, o detecta sinais de término adicionais que não são reconhecidos pela RNA polimerase sozinha.

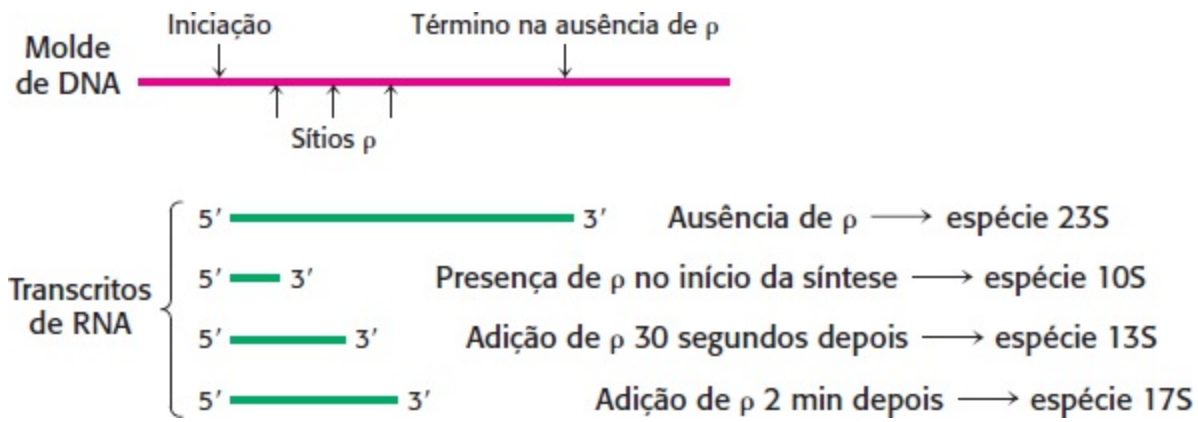


Figura 29.16 Efeito da proteína ρ sobre o tamanho dos transcritos de RNA.

Como ρ provoca o término da síntese de RNA? *Um indício importante é o achado de que a proteína ρ hidrolisa o ATP na presença de RNA de fita simples, mas não na presença de DNA ou de RNA dúplex.* A proteína ρ hexamérica é uma helicase, homóloga à helicase que encontramos na discussão da replicação do DNA (Seção 28.1). Um segmento de nucleotídios liga-se de tal modo que o RNA passa pelo centro da estrutura (Figura 29.17). A proteína ρ é acionada por sequências localizadas no RNA nascente que são ricas em citosina e pobres em guanina. A atividade de helicase de ρ faz com que a proteína afaste o RNA nascente, enquanto segue a RNA polimerase. Quando alcança a RNA polimerase na bolha de transcrição, ela rompe a hélice do híbrido RNA–DNA, atuando como uma RNA–DNA.

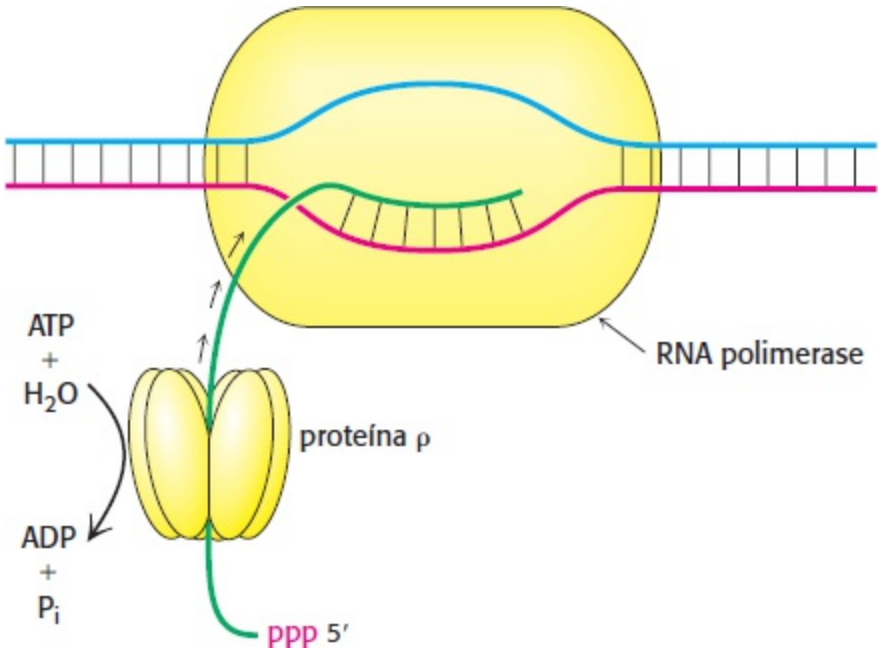
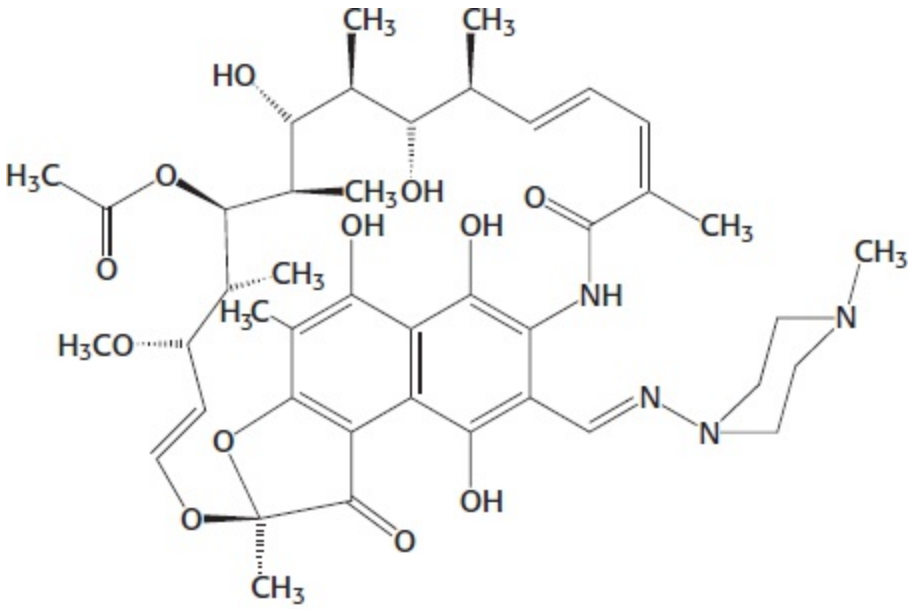


Figura 29.17 Mecanismo para o término da transcrição pela proteína ρ. Essa proteína é uma helicase dependente de ATP, que se liga à cadeia de RNA nascente e a afasta da RNA polimerase e do molde de DNA.

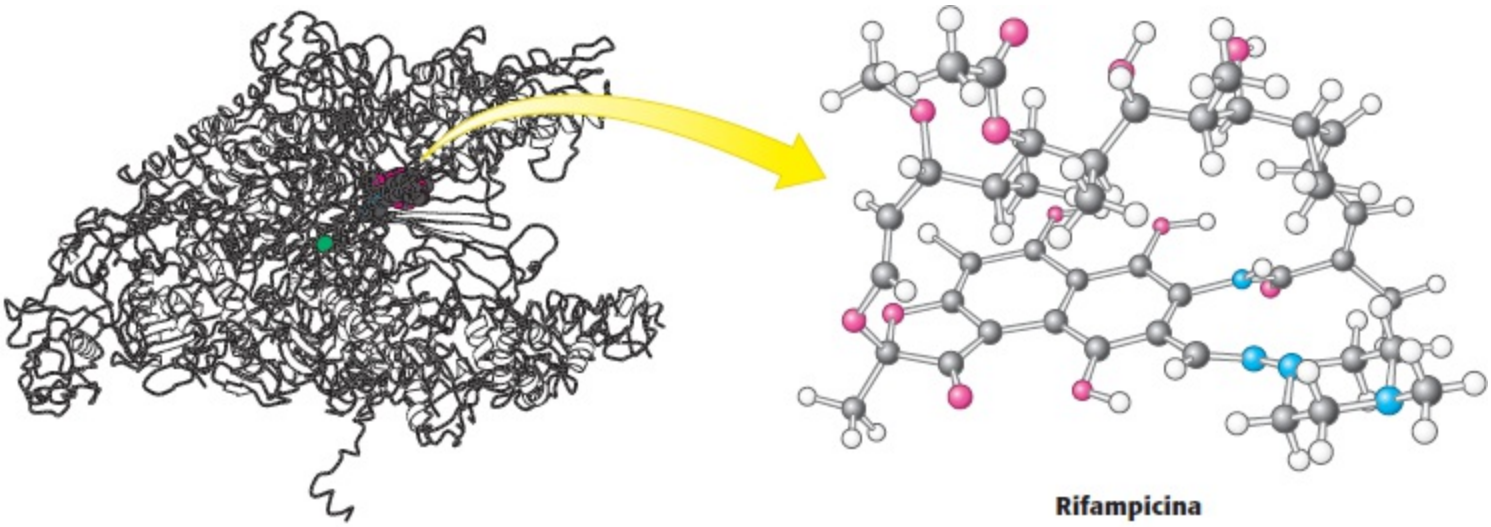
Outras proteínas, além de ρ, podem provocar o término. Por exemplo, a *proteína nusA* faz com que a RNA polimerase de *E. coli* reconheça uma classe característica de sítios de terminação. *Uma característica comum ao término independente e dependente de proteína é o fato de que os sinais funcionais residem no RNA recém-sintetizado, e não no molde de DNA.*

Alguns antibióticos inibem a transcrição

Muitos antibióticos são inibidores altamente específicos de processos biológicos nas bactérias. A rifampicina e a actinomicina são dois antibióticos que inibem a transcrição bacteriana, embora de modos muito diferentes. A *rifampicina* é um derivado semissintético de *rifamicinas*, que são compostos derivados de uma cepa de *Streptomyces*.



Rifampicina



Rifampicina

Figura 29.18 Ação de antibióticos. A rifampicina liga-se a uma bolsa no canal que é normalmente ocupado pelo híbrido RNA–DNA recém-formado. Por conseguinte, o antibiótico bloqueia o alongamento após a adição de apenas dois ou três nucleotídios.

Esse antibiótico *inibe especificamente a iniciação da síntese de RNA*. A rifampicina interfere na formação das primeiras ligações fosfodiéster na cadeia de RNA. A estrutura de um complexo entre uma RNA polimerase procariótica e a rifampicina revela que o antibiótico bloqueia o canal pelo qual deve passar o híbrido RNA-DNA gerado pela enzima (Figura 29.18). O sítio de ligação está a uma distância de 12 Å do próprio sítio ativo. A rifampicina só pode inibir a iniciação da transcrição, mas não o alongamento, visto que o híbrido RNA–DNA presente na enzima durante o alongamento impede a ligação do antibiótico. A bolsa à qual se liga a rifampicina é conservada entre as RNA polimerases bacterianas, mas não nas polimerases eucarióticas, de modo que a rifampicina pode ser utilizada como antibiótico no tratamento da tuberculose.

A *actinomicina D*, um antibiótico contendo um peptídio de uma cepa diferente de *Streptomyces*, inibe a transcrição por um mecanismo totalmente diferente. *A actinomicina D liga-se fortemente e de modo específico ao DNA de dupla-hélice e, portanto, evita que seja um molde efetivo para a síntese de RNA.* Os resultados de estudos espectroscópicos, hidrodinâmicos e estruturais de complexos de actinomicina D e DNA revelam que o anel fenoxazona da actinomicina desliza entre pares de bases no DNA (Figura 29.19). Esse modo de ligação é denominado *intercalação*. Em baixa concentração, a actinomicina D inibe a transcrição sem afetar significativamente a replicação do DNA ou a síntese de proteínas. Por conseguinte, *a actinomicina D é extensamente usada como inibidor altamente específico da formação de novo RNA nas células tanto procarióticas quanto eucarióticas*. Sua capacidade de inibir o crescimento de células em rápida divisão torna a actinomicina D um agente terapêutico efetivo no tratamento de alguns tipos de câncer.

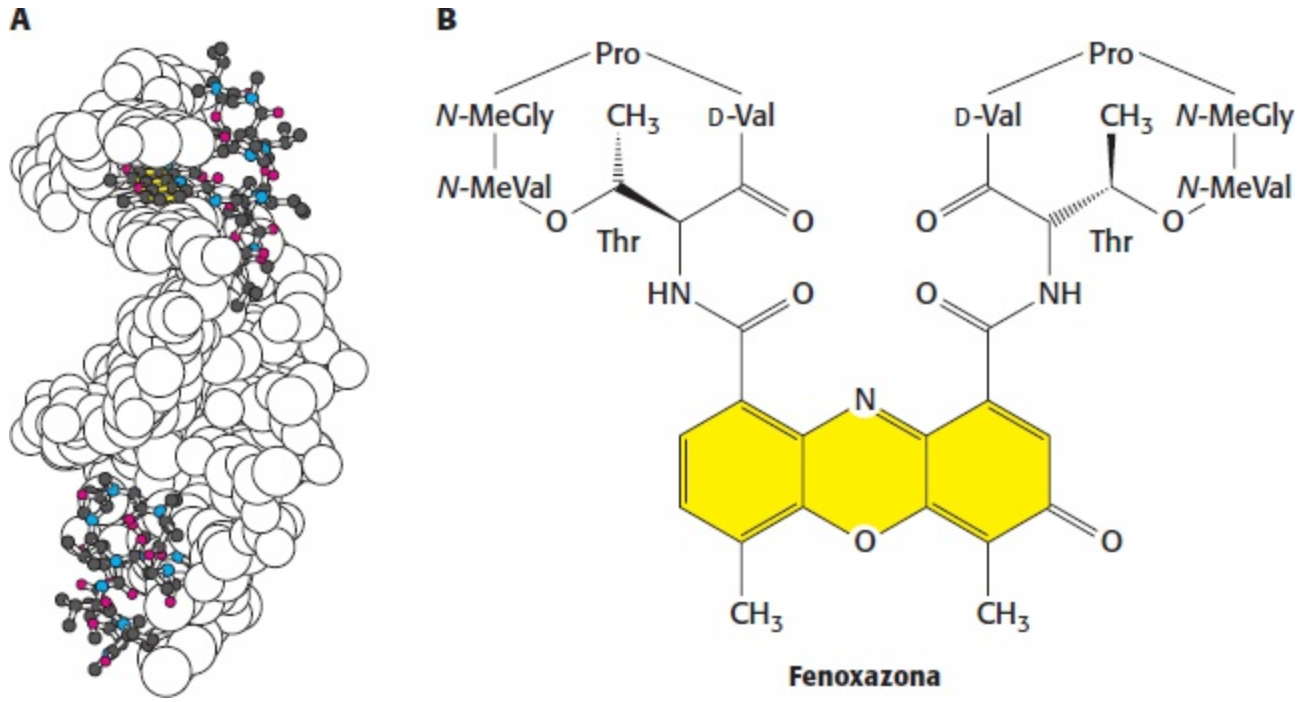


Figura 29.19 Estrutura do complexo actinomicina–DNA. A. Estrutura de um complexo entre um dúplex de DNA (ilustrado como modelo de preenchimento espacial) e a actinomicina B (ilustrada como modelo de bola e bastão). Duas moléculas de actinomicina B estão ligadas no complexo. **B**. A estrutura da actinomicina B, mostrando o anel fenoxazona. *Observe* como a fenoxazona (em amarelo) desliza entre pares de bases do DNA. Me, metila. [Desenhada a partir de 1I3W.pdb.]

Os precursores do RNA transportador e RNA ribossômico são clivados e modificados quimicamente após a transcrição nos procariotos

Nos procariotos, as moléculas de RNA mensageiro sofrem pouca ou nenhuma modificação após a sua síntese pela RNA polimerase. Com efeito, muitas moléculas de mRNA são traduzidas enquanto estão sendo transcritas. Por outro lado, *as moléculas de RNA transportador e RNA ribossômico são produzidas por clivagem e outras modificações de cadeias nascentes de RNA.* Por exemplo, em *E. coli*, os três rRNA e um tRNA são excisados de um único RNA transcrito primário, que também contém regiões espaçadoras (Figura 29.20). Outros transcritos contêm grupos de vários tipos de tRNA ou de várias cópias do mesmo tRNA. As nucleases que clivam e aparam esses precursores de rRNA e tRNA são altamente precisas. A *ribonuclease P* (RNase P), por exemplo, gera a extremidade 5′ terminal correta de todas as moléculas de tRNA em *E. coli*. Sidney Altman e colaboradores mostraram que essa interessante enzima contém uma molécula de RNA cataliticamente ativa. A

ribonuclease III (RNase III) remove os precursores de rRNA de 5S, 16S e 23S do transcrito primário pela clivagem de regiões em grampo de dupla-hélice em sítios específicos.

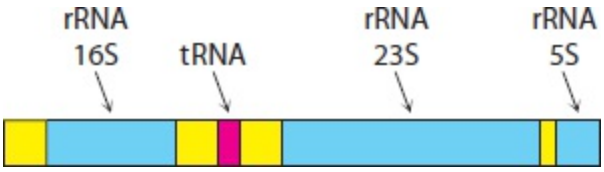
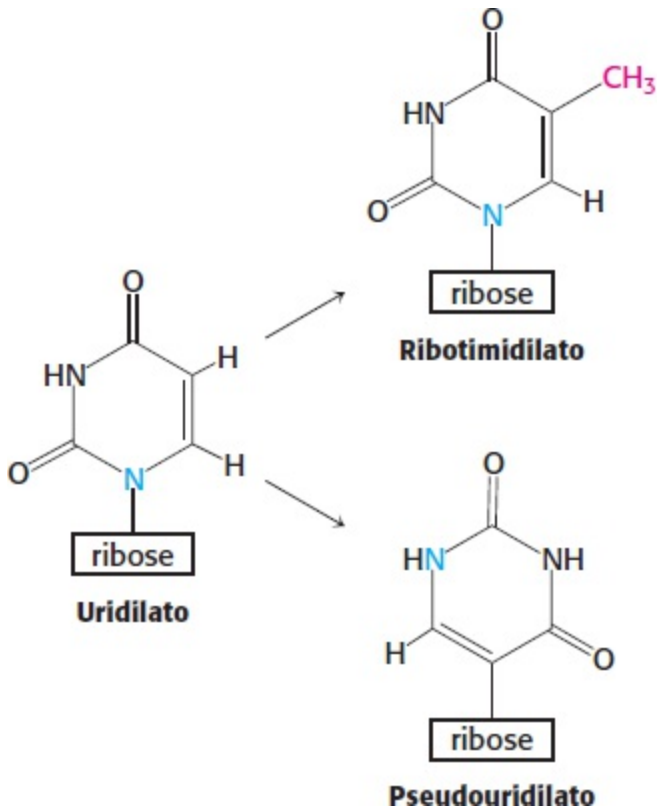


Figura 29.20 Transcrito primário. A clivagem desse transcripto produz moléculas de rRNA 5S, 16S e 23S e uma molécula de tRNA. As regiões espaçadoras são mostradas em amarelo.

Um segundo tipo de processamento é a *adição de nucleotídios às terminações de algumas cadeias de RNA*. Por exemplo, CCA, uma sequência terminal necessária para a função de todos os tRNA, é acrescentada às extremidades 3′ de moléculas de tRNA para as quais essa sequência terminal não é codificada no DNA. A enzima que catalisa a adição de CCA é atípica para uma RNA polimerase, visto que ela não utiliza um molde de DNA. Um terceiro tipo de processamento é a *modificação de unidades de bases e de ribose* dos RNA ribossômicos. Nos procariotos, algumas bases de rRNA são metiladas. São encontradas bases incomuns em todas as moléculas de tRNA. Elas são formadas pela modificação enzimática de um ribonucleotídio padrão em um precursor de tRNA. Por exemplo, resíduos de uridilato são modificados após a transcrição, formando *ribotimidilato* e *pseudouridilato*. Essas modificações geram diversidade, possibilitando maior versatilidade estrutural e funcional.



29.2 A transcrição nos eucariotos é altamente regulada

Veremos agora a transcrição nos eucariotos, um processo muito mais complexo do que nas bactérias. As células eucarióticas têm uma notável capacidade de regular com precisão o tempo em que cada

gene é transcrito, bem como a quantidade de RNA produzida. Em virtude dessa capacidade, alguns eucariotos evoluíram para organismos multicelulares, com tecidos distintos. *Isto é, os eucariotos multicelulares utilizam uma regulação diferencial da transcrição para criar tipos celulares diferentes*. A expressão gênica é influenciada por três características importantes e exclusivas dos eucariotos: a membrana nuclear, a regulação transcricional complexa e o processamento do RNA.

1. *A membrana nuclear. Nos eucariotos, a transcrição e a tradução ocorrem em compartimentos celulares diferentes:* a transcrição ocorre no núcleo delimitado por membrana, enquanto a tradução ocorre fora do núcleo, no citoplasma. Nas bactérias, os dois processos estão estreitamente acoplados (Figura 29.21). Com efeito, a tradução do mRNA bacteriano começa enquanto o transcrito ainda está sendo sintetizado. *A separação espacial e temporal da transcrição e da tradução permite que os eucariotos regulem a expressão gênica de modo muito mais complexo, contribuindo para a riqueza da forma e função dos eucariotos*.

2. *Regulação transcricional complexa*. À semelhança das bactérias, os eucariotos dependem de sequências conservadas no DNA para regular a iniciação da transcrição. Todavia, as bactérias apresentam apenas três elementos promotores (os elementos –10, –35 e UP), enquanto os eucariotos utilizam uma variedade de tipos de elementos promotores, cada um deles identificado pela sua própria sequência conservada. Nem todos os tipos possíveis estarão presentes juntos no mesmo promotor. *Nos eucariotos, os elementos que regulam a transcrição podem ser encontrados em uma variedade de localizações no DNA*, a montante (*upstream)* ou a jusante (*downstream)* do sítio de iniciação e, algumas vezes, a distâncias muito maiores do sítio de iniciação do que nos procariotos. Por exemplo, elementos amplificadores localizados no DNA longe do sítio de iniciação aumentam a atividade promotora de genes específicos.

3. *Processamento do RNA.* Embora tanto as bactérias quanto os eucariotos modifiquem o RNA, *os eucariotos processam extensamente o RNA nascente destinado a se tornar mRNA.* Esse processamento inclui modificações em ambas as extremidades e, de modo mais significativo, *splicing* de segmentos do transcrito primário. O processamento do RNA é descrito na Seção 29.3.

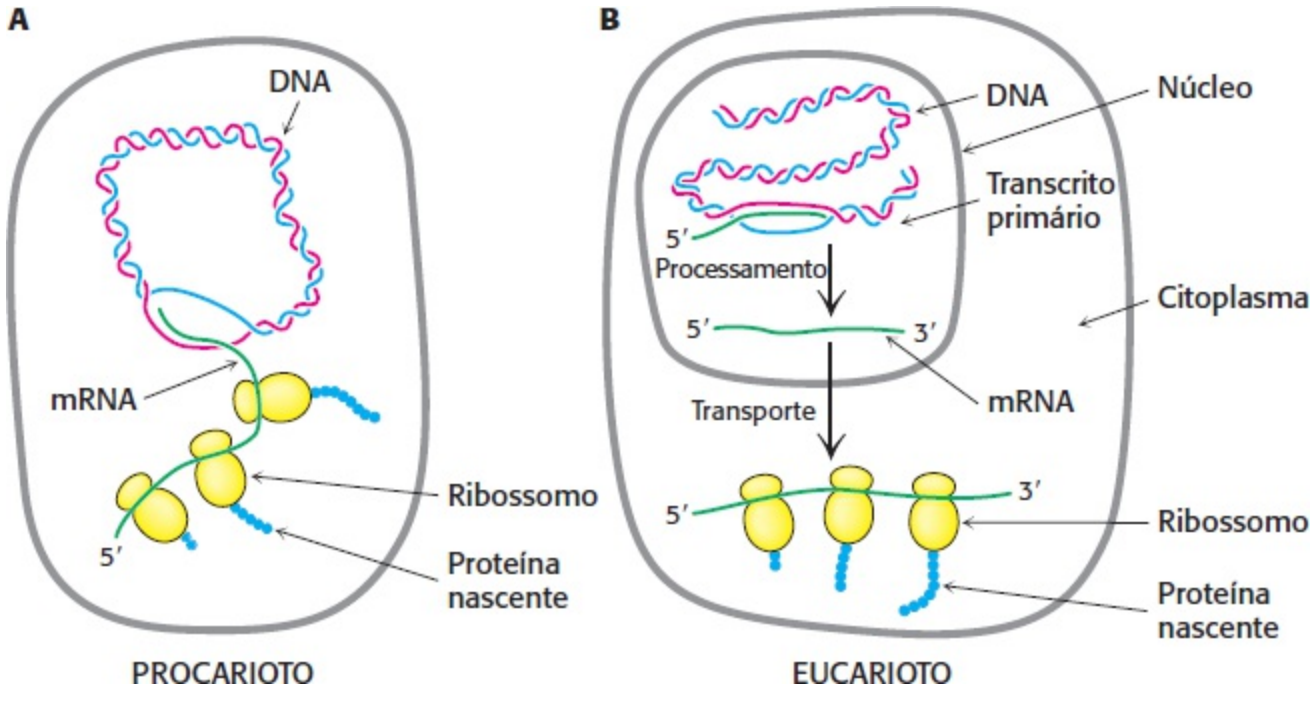


Figura 29.21 Transcrição e tradução. Esses dois processos estão estreitamente acoplados nos procariotos, enquanto são separados tanto no espaço quanto no tempo nos eucariotos. **A**. Nos procariotos, o transcrito primário atua como mRNA e é utilizado imediatamente como molde para a síntese de proteínas. **B**. Nos eucariotos, os precursores de mRNA são processados e sofrem *splicing* no núcleo antes de serem transportados até o citoplasma para tradução em proteínas. [De J. Darnell, H. Lodish, and D. Baltimore. *Molecular Cell Biology*, 2d ed. (Scientific American Books, 1990), p.230.]

Tabela 29.2 RNA polimerases eucarióticas.

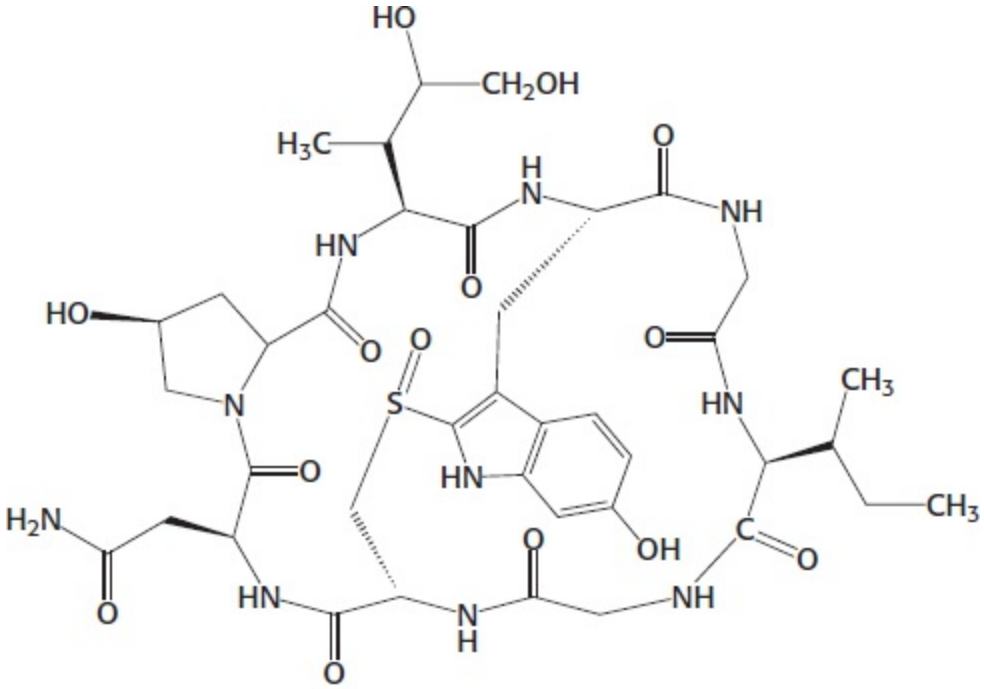
Tipo	Localização	Transcritos celulares	Efeitos da α-amanitina
I	Nucléolo	rRNA 18S, 5,8S, 28S	Insensíveis
II	Nucleoplasma	Precursores de mRNA e snRNA	Fortemente inibidos
III	Nucleoplasma	tRNA e rRNA 5S	Inibidos por altas concentrações

Três tipos de RNA polimerases sintetizam o RNA nas células eucarióticas

Nas bactérias, o RNA é sintetizado por um único tipo de polimerase. Em contrapartida, o núcleo de uma célula eucariótica típica contém três tipos de RNA polimerase que diferem na especificidade pelo molde e localização no núcleo (Tabela 29.2). Todas essas polimerases são proteínas grandes, que contêm 8 a 14 subunidades e que apresentam massas moleculares totais superiores a 500 kDa. A *RNA polimerase I* está localizada em estruturas especializadas dentro do núcleo, denominadas nucléolos, onde transcreve o conjunto de genes sequenciais para o RNA ribossômico 18S, 5,8S e 28S. A outra molécula de RNA ribossômico (rRNA 5S) e todas as moléculas de RNA transportador são sintetizadas pela *RNA polimerase III*, que está localizada no nucleoplasma, mas não nos nucléolos. A *RNA polimerase II*, que também está localizada no nucleoplasma, sintetiza os precursores do RNA mensageiro, bem como várias moléculas de RNA pequeno, como as do aparelho de *splicing* e muitos dos precursores dos RNA reguladores pequenos.

Embora todas as RNA polimerases eucarióticas sejam homólogas entre si e com as RNA polimerases procarióticas, a RNA polimerase II contém um *domínio carboxiterminal* singular na subunidade de 220 kDa, denominado CTD; esse domínio é incomum, visto que ele contém múltiplas repetições de uma sequência de consenso YSPTSPS. A atividade da RNA polimerase II é regulada por fosforilação, principalmente nos resíduos de serina do CTD.

Outra distinção importante entre as polimerases é observada nas suas respostas à toxina α-*amanitina*, um octapeptídio cíclico que contém vários aminoácidos modificados.



α-amanitina

A α-amanitina é produzida pelo cogumelo venenoso *Amanita phalloides*, que também é denominado *chapéu-da-morte* ou *anjo-da-destruição*. Mais de uma centena de mortes ocorrem todo ano pelo mundo em decorrência da ingestão de cogumelos venenosos. A α-amanitina liga-se muito firmemente (K_d = 10 nM) à RNA polimerase II e, assim, bloqueia a fase de alongamento da síntese de RNA. Concentrações mais altas de α-amanitina (1 μM) inibem a polimerase III, enquanto a polimerase I é insensível a essa toxina. Esse padrão de sensibilidade é altamente conservado por todo o reino animal e vegetal.

Amanita phalloides, também denominados *chapéu-da-morte*. [Archenzo/Wikimedia Commons.]

As polimerases eucarióticas também diferem umas das outras nos promotores aos quais se ligam. Os genes eucarióticos, como os procarióticos, necessitam de promotores para a iniciação da transcrição. À semelhança dos promotores procarióticos, os promotores eucarióticos são

constituídos de sequências conservadas que servem para atrair a polimerase ao sítio de iniciação. Entretanto, os promotores eucarióticos diferem nitidamente na sua sequência e posição, dependendo do tipo RNA polimerase à qual se ligam (Figura 29.22).

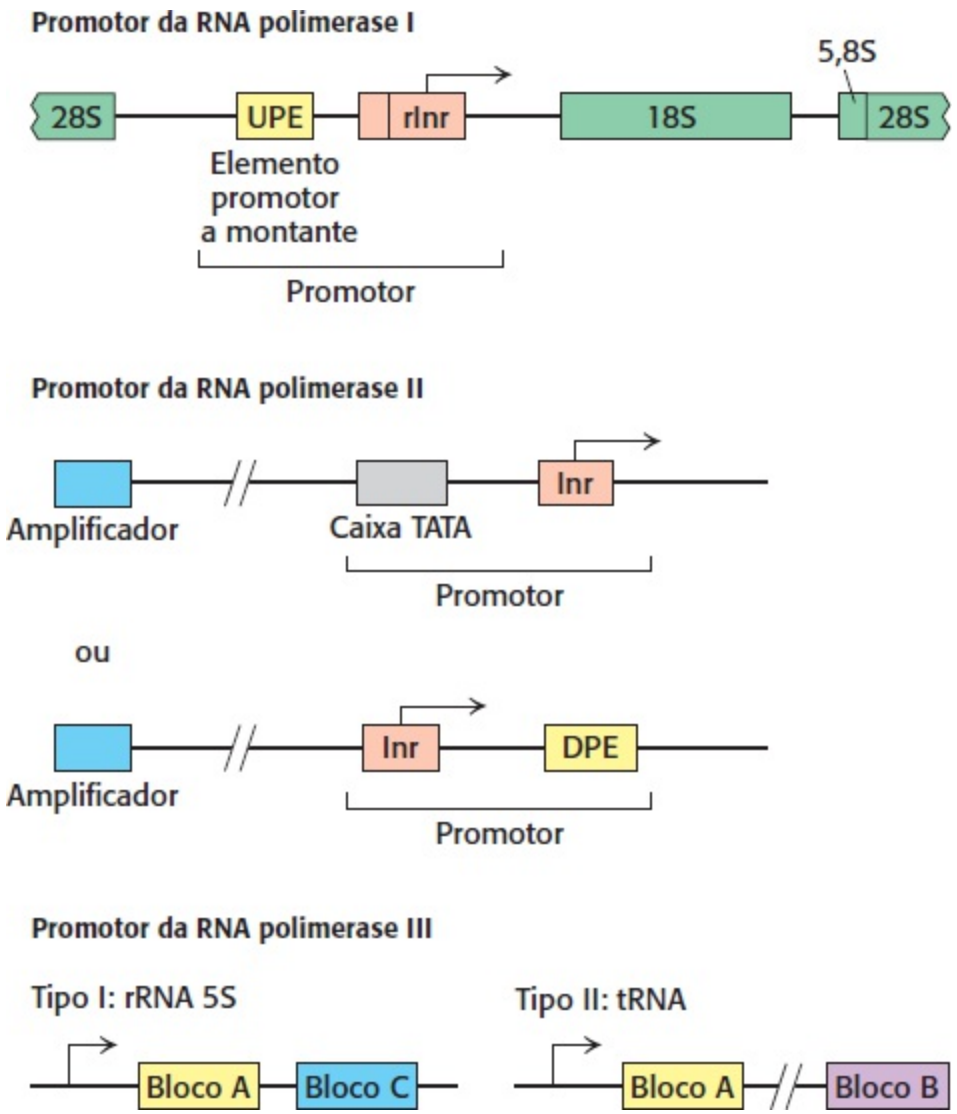


Figura 29.22 Elementos promotores eucarióticos comuns. Cada RNA polimerase eucariótica reconhece um conjunto de elementos de sequências de promotores no DNA, que promovem a transcrição. O promotor da RNA polimerase I consiste em um iniciador ribossômico (rInr) e um elemento promotor a montante (UPE). De forma semelhante, o promotor da RNA polimerase II inclui um elemento iniciador (Inr) e também pode apresentar uma caixa TATA e um elemento promotor a jusante (DPE). Separados da região promotora, os elementos amplificadores ligam-se a fatores de transcrição específicos. Os promotores da RNA polimerase III consistem em sequências conservadas situadas dentro dos genes transcritos.

1. *RNA polimerase I*. O DNA ribossômico (rDNA) transcrito pela polimerase I é disposto em várias centenas de repetições em série, cada uma delas contendo uma cópia de cada um dos três genes de rRNA. As sequências promotoras estão localizadas em segmentos de DNA que separam os genes. No sítio de iniciação da transcrição, existe uma sequência semelhante a TATA, denominada *elemento iniciador ribossômico* (rInr, *do inglês ribosomal initiator element*). A montante, a uma distância de 150 a 200 pb do sítio de iniciação, encontra-se o *elemento promotor a montante* (UPE, *do inglês upstream promotor element*). Ambos os elementos ajudam a transcrição, ligando-se a proteínas que recrutam a RNA polimerase I.

2. *RNA polimerase II*. Os promotores para a RNA polimerase II, à semelhança dos promotores

procarióticos, incluem um conjunto de sequências de consenso que definem o sítio de iniciação e que recrutam a polimerase. Todavia, o promotor pode conter qualquer combinação de várias sequências de consenso possíveis. Eles também incluem elementos amplificadores (*enhancers*), que podem estar muito distantes (mais de 1 kb) do sítio de iniciação, constituindo uma característica exclusiva dos eucariotos.

3. *RNA polimerase III*. Os promotores para a RNA polimerase III estão *dentro* da sequência transcrita, a jusante do sítio de iniciação. Existem dois tipos de promotores intergênicos para a RNA polimerase III. Os promotores tipo I, encontrados no gene de rRNA 5S, contêm duas sequências conservadas curtas, conhecidas como bloco A e bloco C. Os promotores tipo II, encontrados nos genes de tRNA, consistem em duas sequências de 11 pb, o bloco A e o bloco B, situadas a cerca de 15 pb de ambas as extremidades do gene.

Três elementos comuns podem ser encontrados na região promotora da RNA polimerase II

A RNA polimerase II transcreve todos os genes codificadores de proteínas nas células eucarióticas. Os promotores para a RNA polimerase II, à semelhança daqueles para as polimerases bacterianas, estão geralmente localizados no lado 5′ do sítio de iniciação da transcrição. Como essas sequências estão na *mesma* molécula de DNA do que os genes que estão sendo transcritos, são denominadas *elementos de ação cis*. O elemento de ação cis mais comumente reconhecido para genes transcritos pela RNA polimerase II é denominado caixa *TATA*, com base em sua sequência de consenso (Figura 29.23). A caixa TATA é habitualmente encontrada entre as posições –30 e –100. Observe que a caixa TATA eucariótica assemelha-se estreitamente à sequência –10 procarióticas (TATAAT), porém está mais distante do sítio de iniciação. A mutação de uma única base na caixa TATA compromete acentuadamente a atividade promotora. Por conseguinte, a sequência precisa, e não apenas o alto conteúdo de pares de AT, é essencial.

A caixa TATA frequentemente está pareado com um *elemento iniciador* (Inr), uma sequência encontrada no sítio de iniciação da transcrição, entre as posições –3 e +5. Essa sequência define o sítio de iniciação, visto que os outros elementos promotores estão a distâncias variáveis desse local. A sua presença aumenta a atividade de transcrição.

Figura 29.23 Caixa TATA. Comparações das sequências de mais de 100 promotores eucarióticos levaram à sequência de consenso mostrada. Os subscritos indicam a frequência (%) da base nessa posição.

Figura 29.24 Caixa CAAT e caixa GC. Sequências de consenso para as caixas CAAT e GC de promotores eucarióticos para precursores de mRNA.

Um terceiro elemento, o *elemento a jusante do cerne do promotor* (DPE, *do inglês downstream*

core promotor element), costuma ser encontrado em associação ao Inr em transcritos que carecem da caixa TATA. Diferentemente da caixa TATA, o DPE é encontrado a jusante do sítio de iniciação, entre as posições +28 e +32.

Sequências reguladoras adicionais estão localizadas entre –40 e –150. Muitos promotores contêm uma *caixa CAAT*, e alguns apresentam uma *caixa GC* (Figura 29.24). Os genes constitutivos (genes que são continuamente expressos, em lugar de regulados) tendem a apresentar caixas GC em seus promotores. A posição dessas sequências a montante varia de um promotor para outro, contrastando com a localização bastante constante da região –35 nos procariotos. Outra diferença é que a caixa CAAT e a caixa GC podem ser efetivas quando presentes na fita-molde (antissentido), ao contrário da região –35, que precisa estar presente na fita codificante (sentido). Essas diferenças entre procariotos e eucariotos correspondem a mecanismos fundamentalmente distintos para o reconhecimento dos elementos de ação cis. As sequências –10 e –35 nos promotores procarióticos são sítios de ligação para a RNA polimerase e seu fator σ associado. Por outro lado, as caixas TATA, CAAT e GC e outros elementos de ação cis nos promotores eucarióticos são reconhecidos por outras proteínas que não a própria RNA polimerase.

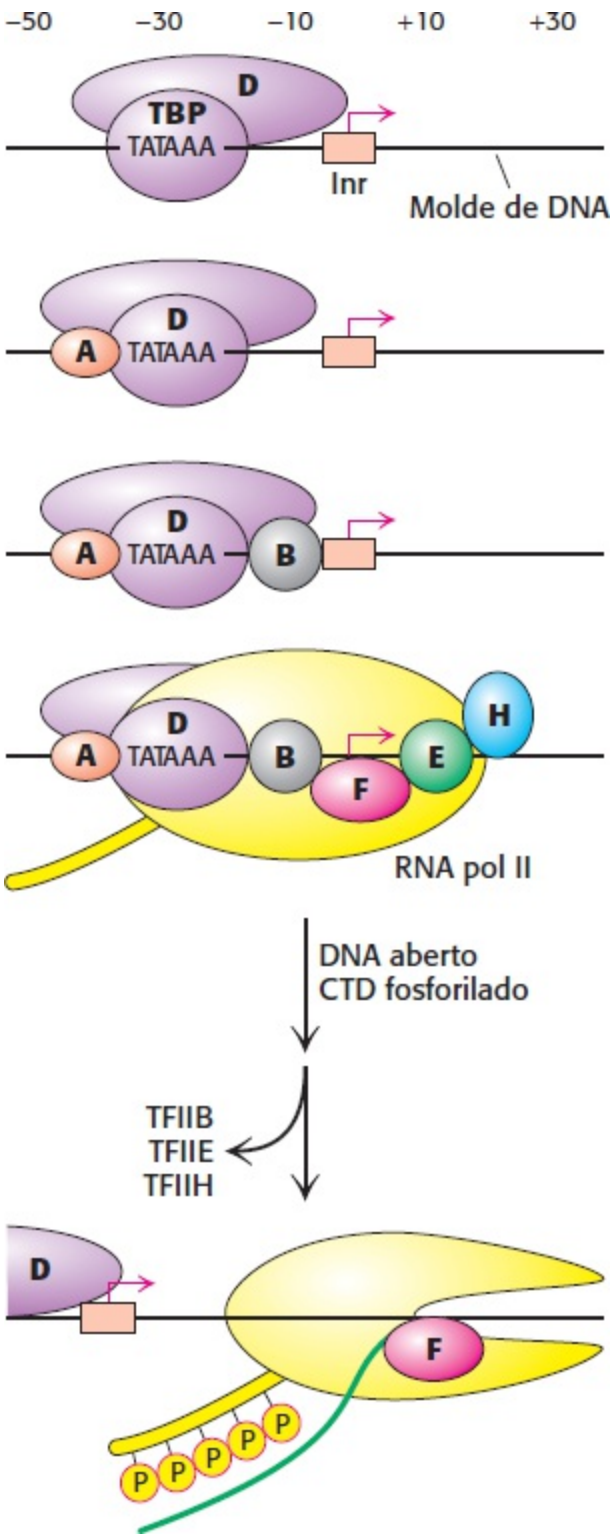


Figura 29.25 Iniciação da transcrição. Os fatores de transcrição TFIIA, B, D, E, F e H são essenciais para a iniciação da transcrição pela RNA polimerase II. A montagem passo a passo desses fatores gerais de transcrição começa com a ligação de TFIID (violeta) à caixa TATA. [A proteína de ligação da caixa TATA (TBP), um componente do TFIID, reconhece a caixa TATA.] Após a montagem, o TFIIH abre a duplahélice de DNA e fosforila o domínio carboxiterminal (CTD), de modo que a polimerase possa deixar o promotor e iniciar a transcrição. A seta vermelha marca o sítio de iniciação da transcrição.

O complexo proteico TFIID inicia a montagem do complexo de transcrição ativo

Os elementos de ação cis constituem apenas uma parte do quebra-cabeça da expressão gênica dos eucariotos. São também necessários *fatores de transcrição* que se ligam a esses elementos. Por exemplo, a RNA polimerase II é orientada para o sítio de iniciação por um conjunto de fatores de transcrição, conhecidos coletivamente como *TFII* (*TF, do inglês transcription factor*; *II* refere-se à

RNA polimerase II). Os fatores TFII individuais são denominados TFIIA, TFIIB, e assim por diante.

Nos promotores da caixa TATA, o evento-chave inicial é o reconhecimento da caixa TATA pela proteína de ligação da caixa TATA (TBP, *do inglês TATA-box-binding protein)*, um componente de 30 kDa do complexo TFIID de 700 kDa (Figura 29.25). Nos promotores sem TATA, outras proteínas no complexo TFIID ligam-se ao cerne dos elementos promotores; todavia, como sabemos menos a respeito dessas interações, consideraremos apenas a interação de ligação da caixa TATA-TBP. A TBP liga-se 10^5 vezes mais firmemente à caixa TATA do que a sequências sem consenso; a constante de dissociação do complexo TBP-caixa TATA é de aproximadamente 1 nM. A TBP é uma proteína em forma de sela, constituída de dois domínios semelhantes (Figura 29.26). A caixa TATA do DNA liga-se à superfície côncava da TBP. Essa ligação induz grandes mudanças conformacionais no DNA ligado. A dupla-hélice é substancialmente desenrolada para alargar seu *sulco menor*, possibilitando o seu contato extenso com as fitas β antiparalelas do lado côncavo da TBP. As interações hidrofóbicas são proeminentes nessa interface. Por exemplo, quatro resíduos de fenilalanina estão intercalados entre pares de bases da caixa TATA. A flexibilidade das sequências ricas em AT é geralmente explorada aqui para dobrar o DNA. Imediatamente fora da caixa TATA, o B-DNA clássico retorna. O complexo TBP-caixa TATA é distintamente assimétrico. A assimetria é crucial para especificar um sítio de iniciação único e assegurar que a transcrição prossiga de modo unidirecional.

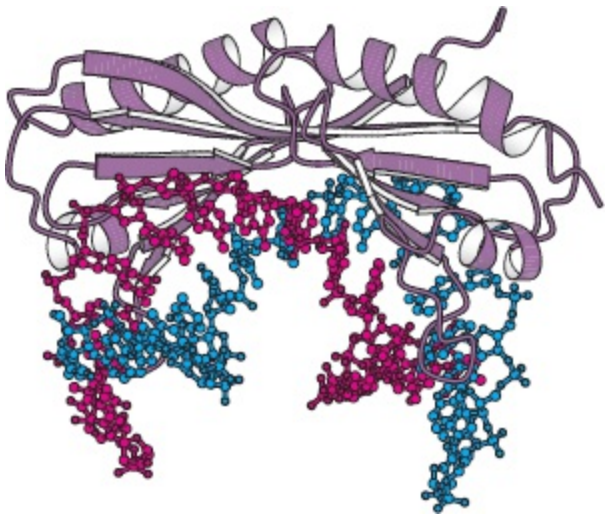


Figura 29.26 Complexo formado pela proteína de ligação da caixa TATA e o DNA. A estrutura semelhante a uma sela da proteína acomoda-se sobre o fragmento de DNA. *Observe* que o DNA está significativamente desenrolado e curvado. [Desenhada a partir de 1CDW.pdb.]

A TBP ligada à caixa TATA é o centro do complexo de iniciação (ver Figura 29.25). A superfície da sela da TBP fornece sítios de ancoragem para a ligação de outros componentes. Outros fatores de transcrição são montados nesse núcleo, em uma sequência definida. O TFIIA é recrutado, seguido do TFIIB; a seguir, o TFIIF, a RNA polimerase II, o TFIIE e o TFIIH unem-se aos outros fatores, formando um complexo denominado *aparelho basal de transcrição*. Durante a formação do aparelho basal de transcrição, o domínio carboxiterminal (CTD, *do inglês carboxyl-terminal domain*) não é fosforilado e desempenha um papel na regulação da transcrição por meio de sua ligação a um complexo associado ao amplificador, denominado mediador (ver Seção 32.2). O CTD fosforilado estabiliza o alongamento da transcrição pela RNA polimerase II e recruta enzimas de processamento do RNA, que atuam durante o alongamento. *A fosforilação do CTD pelo TFIIH marca a transição da*

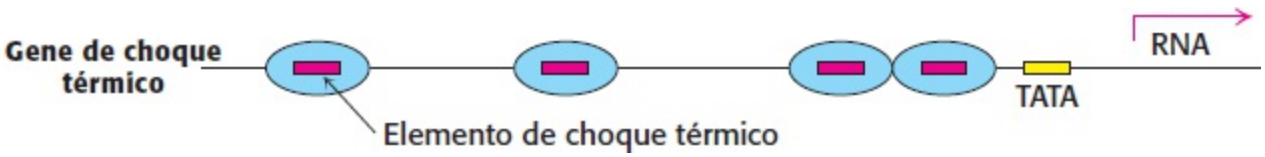
iniciação para o alongamento. A importância do domínio carboxiterminal é destacada pelo achado de que leveduras contendo a polimerase II mutante com menos de 10 repetições no CTD não são viáveis. Os fatores são, em sua maioria, liberados antes que a polimerase saia do promotor e possa então participar em outro ciclo de iniciação.

Múltiplos fatores de transcrição interagem com promotores eucarióticos

O complexo basal de transcrição descrito na seção anterior inicia a transcrição em baixa frequência. São necessários outros fatores de transcrição que se ligam a outros sítios para alcançar uma alta taxa de síntese de mRNA. Seu papel consiste em estimular seletivamente genes específicos. Os sítios estimuladores a montante nos genes eucarióticos são diversos na sua sequência e variáveis nas suas posições. Essa variedade sugere que eles sejam reconhecidos por muitas proteínas específicas diferentes. De fato, foram isolados muitos fatores de transcrição, e seus sítios de ligação foram identificados por experimentos de *footprinting*. Por exemplo, o *fator de transcrição de choque térmico* (HSTF, *do inglês heat-shock transcription factor*) é expresso em *Drosophila* depois de uma elevação abrupta da temperatura. Essa proteína de ligação ao DNA de 93 kDa liga-se à sequência de consenso seguinte:

5′–CNNGAANNTCCNNG–3′

Várias cópias dessa sequência, conhecida como *elemento de resposta ao choque térmico*, estão presentes, começando em um sítio a uma distância de 15 pb a montante da caixa TATA.



O HSTF difere do σ^{32}, uma proteína de choque térmico de *E. coli* (p. 864), visto que se liga diretamente aos elementos de resposta nos promotores de choque térmico, em lugar de se associar inicialmente à RNA polimerase.

As sequências amplificadoras podem estimular a transcrição em sítios de iniciação a uma distância de milhares de bases

As atividades de muitos promotores nos eucariotos superiores são acentuadamente aumentadas por outro tipo de elemento de ação cis, denominado *amplificador*. As sequências do amplificador carecem de atividade de promotor; *contudo, podem exercer suas ações estimuladoras a distâncias de vários milhares de pares de bases. Podem estar a montante, a jusante ou até mesmo no meio de um gene transcrito*. Além disso, os amplificadores mostram-se efetivos quando presentes em *qualquer fita de DNA* (de modo equivalente, em qualquer sentido).

Um determinado amplificador só é efetivo em certas células. Por exemplo, o amplificador de imunoglobulinas atua nos linfócitos B, mas não em outras células. Pode ocorrer câncer se a relação entre genes e amplificadores for perturbada. No linfoma de Burkitt e na leucemia de células B, uma translocação cromossômica coloca o proto-oncogene *myc* (um fator de transcrição em si) sob o controle de um poderoso amplificador de imunoglobulinas. Acredita-se que a desregulação

consequente do gene *myc* possa desempenhar um papel na progressão do câncer.

Os fatores de transcrição e outras proteínas que se ligam a sítios reguladores no DNA podem ser considerados como senhas que abrem cooperativamente diversas fechaduras, dando à RNA polimerase acesso a genes específicos. A descoberta dos promotores e dos amplificadores nos ajudou a compreender melhor como os genes são seletivamente expressos nas células eucarióticas. A regulação da transcrição gênica, que será discutida no Capítulo 32, constitui o meio fundamental de controlar a expressão gênica.

Embora bactérias careçam de TBP, Archaea utilizam uma molécula de TBP que, do ponto de vista estrutural, é muito semelhante à proteína eucariótica. Com efeito, os processos de controle da transcrição nos Archaea são, em geral, muito mais semelhantes aos dos eucariotos do que os que ocorrem nas bactérias. Muitos componentes do mecanismo de transcrição dos eucariotos evoluíram a partir de um ancestral de Archaea.

29.3 Os produtos de transcrição das polimerases eucarióticas são processados

Praticamente todos os produtos iniciais de transcrição são subsequentemente processados nos eucariotos. Por exemplo, os transcritos primários (moléculas de pré-mRNA), produtos da ação da RNA polimerase II, adquirem um *cap* em suas extremidades 5′ e uma cauda poli(A) em suas extremidades 3′. Mais importante, *quase todos os precursores de mRNA nos eucariotos superiores sofrem splicing*. Os íntrons são excisados com precisão dos transcritos primários, enquanto os éxons são unidos para formar mRNA maduros com mensagens contínuas. Alguns mRNA maduros apresentam apenas um décimo do tamanho de seus precursores, que podem alcançar 30 kb ou mais. O padrão de *splicing* pode ser regulado no curso do desenvolvimento para produzir variações de um tema, como formas de moléculas de anticorpo ligadas à membrana ou secretadas. O *splicing* alternativo aumenta o repertório de proteínas nos eucariotos e fornece uma ilustração clara da razão pela qual o proteoma é mais complexo do que o genoma. As etapas particulares de processamento e os fatores que participam variam de acordo com o tipo de RNA polimerase.

A RNA polimerase I produz três RNA ribossômicos

Várias moléculas de RNA são componentes-chave dos ribossomos. A transcrição pela RNA polimerase I produz um único precursor (45S nos mamíferos), que codifica três componentes de RNA do ribossomo: o rRNA 18S, o rRNA 28S e o rRNA 5,8S (Figura 29.27). O rRNA 18S é o componente de RNA da subunidade ribossômica pequena (40S), enquanto os rRNA 28S e 5,8S são os dois componentes de RNA da subunidade ribossômica grande (60S). O outro RNA componente da subunidade ribossômica grande, o rRNA 5S, é transcrito pela RNA polimerase III como transcrito separado.

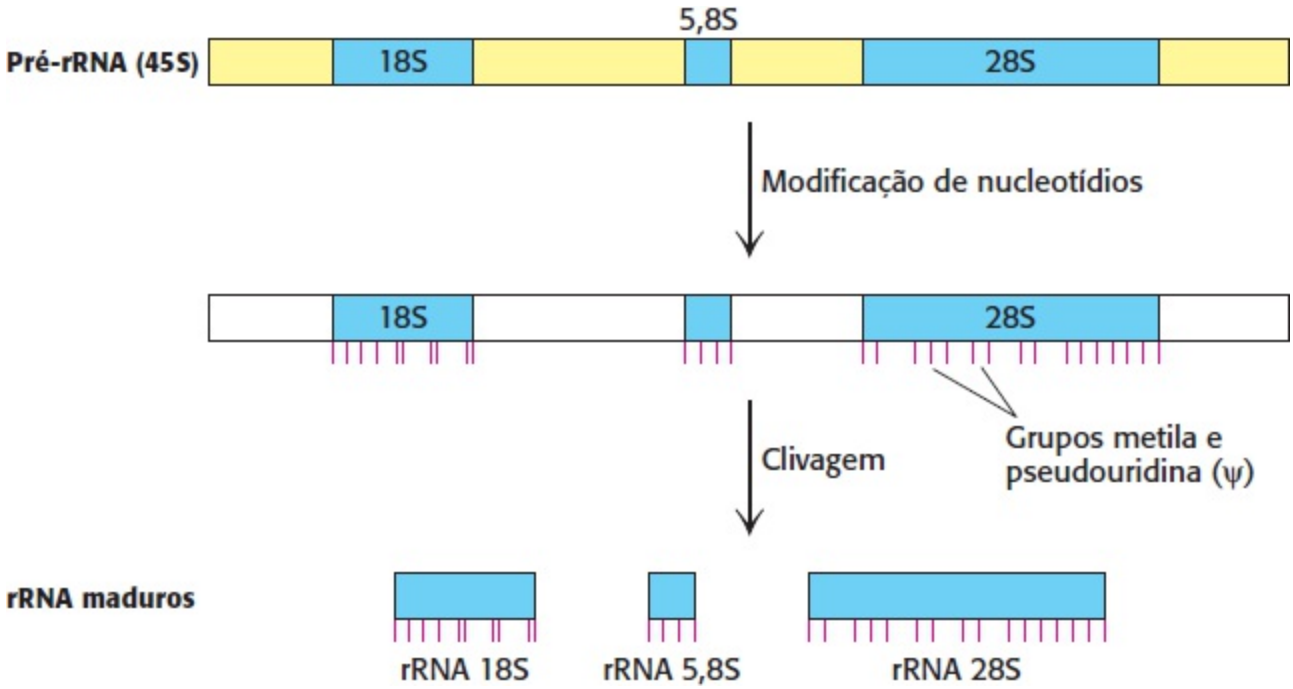


Figura 29.27 Processamento do pré-rRNA eucariótico. O pré-rRNA transcrito de mamíferos contém as sequências de RNA destinadas a se tornarem rRNA 18S, 5,8S e 28S das subunidades ribossômicas menor e maior. Em primeiro lugar, os nucleotídios são modificados: pequenas ribonucleoproteínas nucleolares metilam grupos específicos de ribose e convertem uridinas selecionadas em pseudouridinas (indicadas por linhas vermelhas). Em seguida, o pré-rRNA é clivado e acondicionado para formar ribossomos maduros, em um processo altamente regulado no qual participam mais de 200 proteínas.

A clivagem do precursor em três rRNA separados constitui, na verdade, a etapa final no seu processamento. Em primeiro lugar, os nucleotídios das sequências de pré-rRNA destinados ao ribossomo sofrem modificação extensa, tanto na ribose quanto nas bases componentes, um processo dirigido por muitas *ribonucleoproteínas nucleolares pequenas* (snoRNP, *do inglês small nucleolar ribonucleoproteins*), cada uma das quais é constituída de um snoRNA e de várias proteínas. Ocorre montagem do pré-rRNA com proteínas ribossômicas, orientada por fatores de processamento, formando uma grande ribonucleoproteína. Por exemplo, o processomo de subunidade pequena (SSU, *do inglês small-subunit*) é necessário para a síntese de rRNA 18S e pode ser visualizado em micrografias eletrônicas como uma protuberância terminal nas extremidades 5′ dos rRNA nascentes (Figura 29.28). Por fim, a clivagem do rRNA (algumas vezes acopladas a etapas adicionais de processamento) libera os rRNA maduros montados com proteínas ribossômicas, na forma de ribossomos. Como na própria transcrição da RNA polimerase I, a maioria dessas etapas de processamento ocorre no nucléolo da célula, um subcompartimento nuclear.

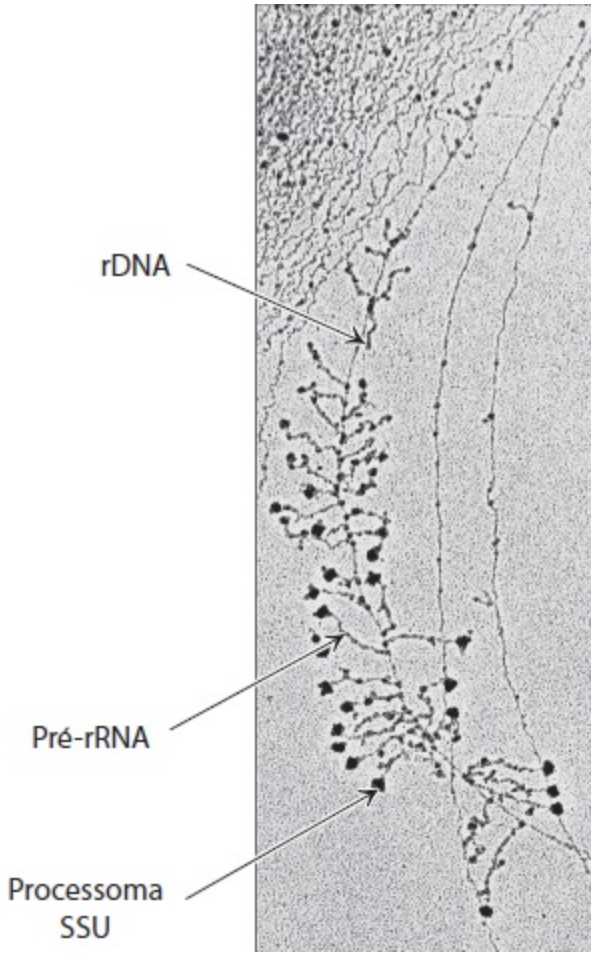


Figura 29.28 Visualização da transcrição do rRNA e processamento nos eucariotos. A transcrição do rRNA e a sua montagem em ribossomos precursores podem ser visualizadas por microscopia eletrônica. As estruturas assemelham-se a árvores de natal: o tronco é o rDNA, e cada ramo é um transcrito de pré-rRNA. A transcrição começa no topo da árvore, onde os transcritos mais curtos podem ser vistos, e progride pelo rDNA até o final do gene. As protuberâncias terminais visíveis na extremidade de alguns transcritos de pré-rRNA provavelmente correspondem ao processomo SSU, uma grande ribonucleoproteína necessária para o processamento do pré-rRNA. [De F. Dragon *et al. Nature* 417:967-970, 2002.]

A RNA polimerase III produz RNA transportador

Os tRNA transcritos eucarióticos estão entre os mais processados de todos os transcritos da RNA polimerase III. Como nos tRNA procarióticos, o líder 5′ é clivado pela RNase P, o *trailer* 3′ é removido, e ocorre adição de CCA pela enzima de adição de CCA (Figura 29.29). Os tRNA eucarióticos também são intensamente modificados nas frações de base e ribose. Essas modificações são importantes para a função. Diferentemente dos tRNA procarióticos, muitos pré-tRNA eucarióticos também sofrem *splicing* por uma endonuclease e uma ligase para remover um íntron.

O produto da RNA polimerase II, o transcrito de pré-mRNA, adquire um *cap* 5′ e uma cauda poli(A) 3′

Talvez o produto de transcrição mais extensamente estudado seja o produto da RNA polimerase II: a maior parte desse RNA será processada a mRNA. O produto imediato da RNA polimerase II é algumas vezes designado como precursor do RNA mensageiro ou *pré-mRNA*. A maioria das moléculas de pré-mRNA sofre *splicing* para remover os íntrons. Além disso, ambas as extremidades 5′ e 3′ são modificadas, e ambas as modificações são retidas à medida que o pré-mRNA é convertido em mRNA.

À semelhança dos procariotos, a transcrição eucariótica começa habitualmente com A ou G. Entretanto, a extremidade trifosfato 5′ da cadeia nascente de RNA é imediatamente modificada. Em primeiro lugar, um grupo fosforila é liberado por hidrólise. A extremidade difosfato 5′ ataca então o átomo de fósforo α do GTP, formando uma ligação trifosfato 5′-5′ muito incomum. Essa extremidade distinta é denominada *cap* (Figura 29.30). O nitrogênio N-7 da guanina terminal é então metilado pela *S*-adenosilmetionina, formando o *cap 0*. As riboses adjacentes podem ser metiladas para formar o *cap 1* ou *cap 2*. As moléculas de RNA transportador e de RNA ribossômico, ao contrário dos RNA mensageiros e dos RNA pequenos que participam do *splicing*, não apresentam cap. Caps contribuem para a estabilidade dos mRNA ao protegerem suas extremidades 5′ das fosfatases e nucleases. Além disso, os caps intensificam a tradução do mRNA por sistemas de síntese de proteínas nos eucariotos.

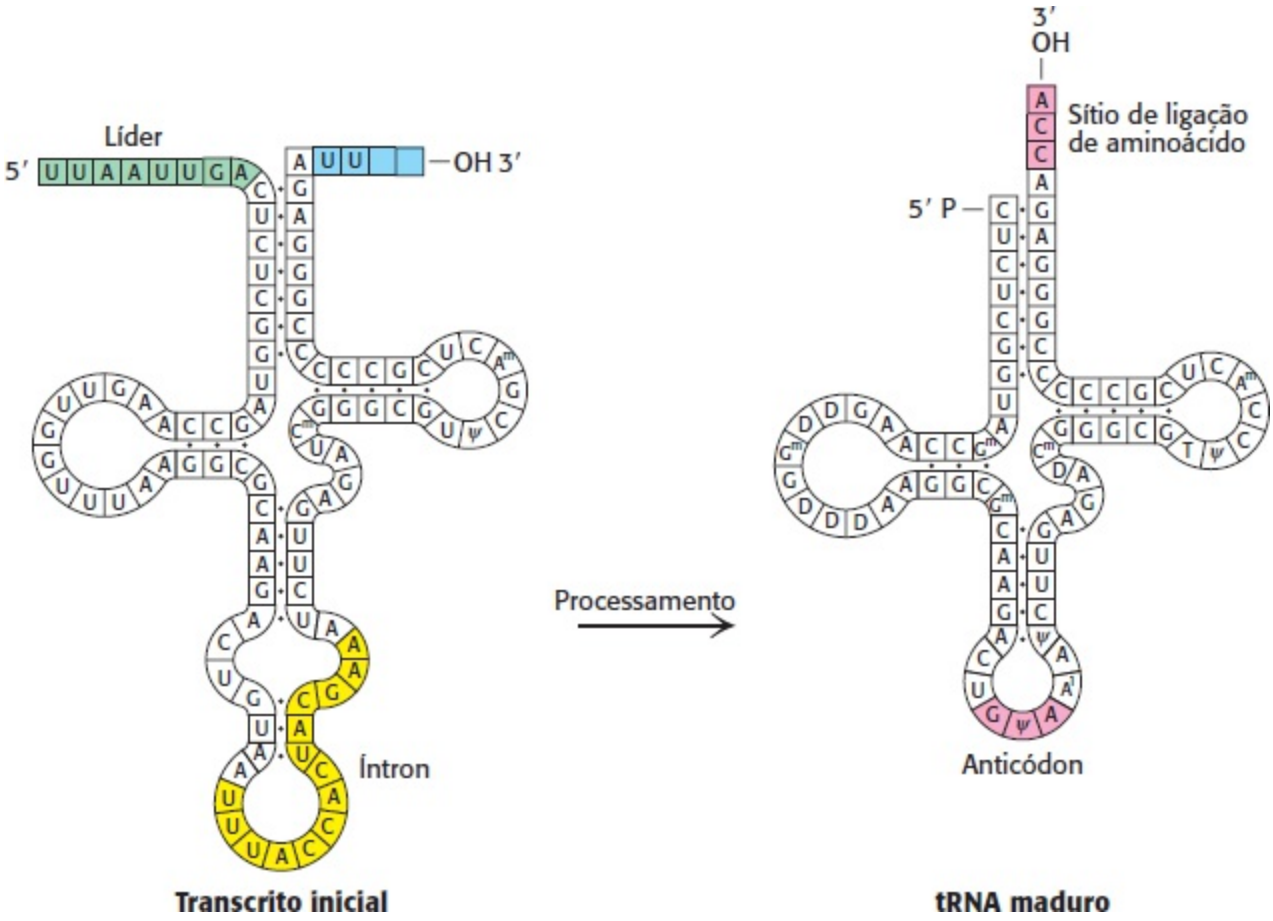


Figura 29.29 Processamento do precursor de RNA transportador. A conversão de um precursor de tRNA de levedura em um tRNA maduro requer a remoção de um íntron de 14 nucleotídios (em amarelo), a clivagem de um líder 5′ (em verde) e a remoção de UU e ligação de CCA à extremidade 3′ (em vermelho). Além disso, várias bases são modificadas.

Conforme assinalado anteriormente, o pré-mRNA também é modificado na extremidade 3′. *A maioria dos mRNA eucarióticos contém uma cauda de poliadenilato, a poli(A), nessa extremidade*, que é adicionada após o término da transcrição. O molde de DNA não codifica essa cauda poli(A). De fato, o nucleotídio que precede a poli(A) não é o último a ser transcrito. Alguns transcritos primários contêm centenas de nucleotídios além da extremidade 3′ do mRNA maduro.

Como a extremidade 3′ do pré-mRNA adquire a sua forma final? *Os transcritos primários eucarióticos são clivados por uma endonuclease específica, que reconhece a sequência AAUAAA* (Figura 29.31). Não ocorre clivagem se há deleção dessa sequência ou de um segmento de cerca de 20 nucleotídios em sua extremidade 3′. A presença de sequências internas AAUAAA em alguns

mRNA maduros indica que AAUAAA é apenas parte do sinal de clivagem; seu contexto também é importante. Após a clivagem do pré-RNA pela endonuclease, uma *poli(A) polimerase* acrescenta cerca de 250 resíduos de adenilato à extremidade 3′ do transcrito; o ATP é o doador nessa reação.

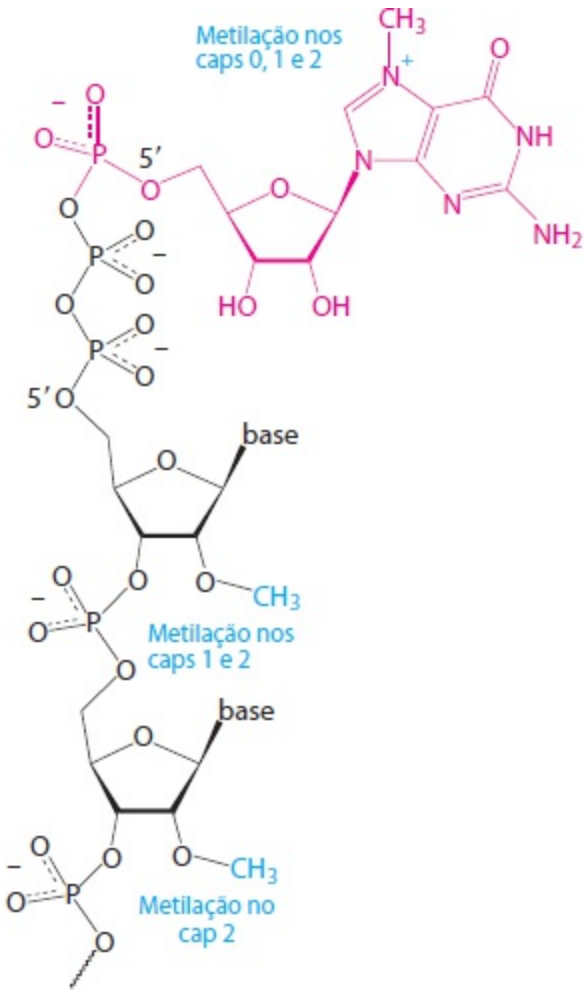


Figura 29.30 Adição do cap na extremidade 5′. Os caps na extremidade 5′ do mRNA eucariótico incluem 7-metilguanilato (em vermelho) fixado por uma ligação trifosfato à ribose na extremidade 5′. Nenhuma das riboses é metilada no cap 0, uma é metilada no cap 1, e ambas são metiladas no cap 2.

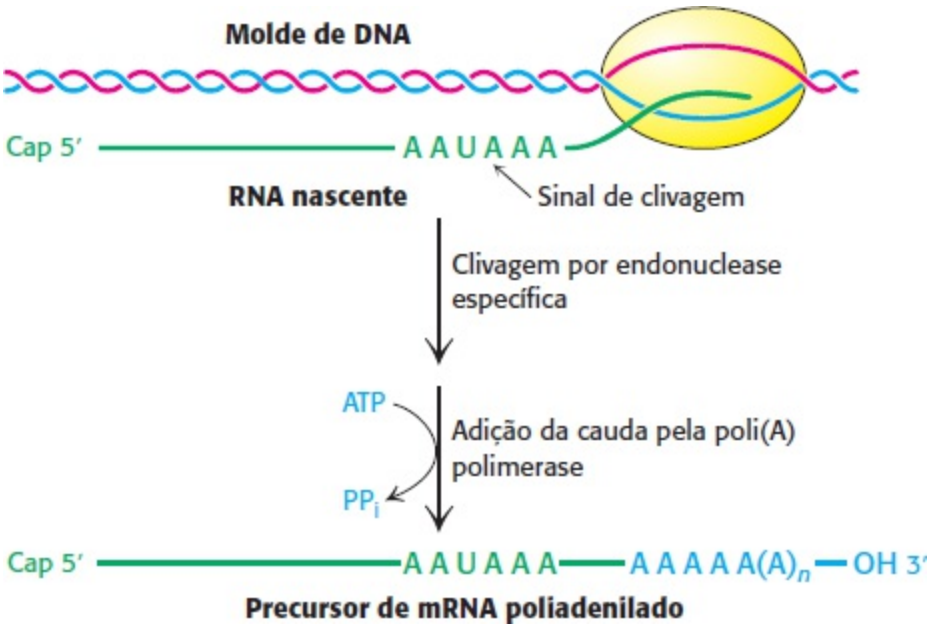


Figura 29.31 Poliadenilação de um transcrito primário. Uma endonuclease específica cliva o RNA a jusante a AAUAAA. Em seguida, a poli(A) polimerase acrescenta cerca de 250 resíduos adenilato.

O papel da cauda poli(A) ainda não está firmemente estabelecido, a despeito de muitos esforços. Entretanto, há cada vez mais evidências de que ela aumenta a eficiência da tradução e a estabilidade do mRNA. O bloqueio da síntese da cauda de poli(A) por exposição à *3'-desoxiadenosina (cordicepina)* não interfere na síntese do transcrito primário. O RNA mensageiro desprovido de cauda poli(A) pode ser transportado para fora do núcleo. Todavia, uma molécula de mRNA sem cauda poli(A) constitui, habitualmente, um molde muito menos efetivo para a síntese de proteínas do que uma molécula com uma cauda poli(A). Com efeito, alguns mRNA são armazenados em uma forma não adenilada e só recebem a cauda poli(A) quando a tradução está iminente. A meia-vida de uma molécula de mRNA pode ser determinada, em parte, pela taxa de degradação de sua cauda poli(A).

Os RNA reguladores pequenos são clivados a partir de precursores maiores

A clivagem desempenha um papel no processamento de pequenos RNA de fita simples (aproximadamente 20 a 23 nucleotídios), denominados *microRNA*. Os microRNA desempenham papéis essenciais na regulação dos genes dos eucariotos, como veremos no Capítulo 32. São formados a partir de transcritos iniciais produzidos pela RNA polimerase II e, em alguns casos, pela RNA polimerase III. Esses transcritos dobram-se em estruturas em forma de grampo de cabelo, que são clivadas por nucleases específicas em vários estágios (Figura 29.32). Os RNA finais de fita simples são ligados por membros da família Argonauta de proteínas para exercer suas funções no controle da expressão gênica.

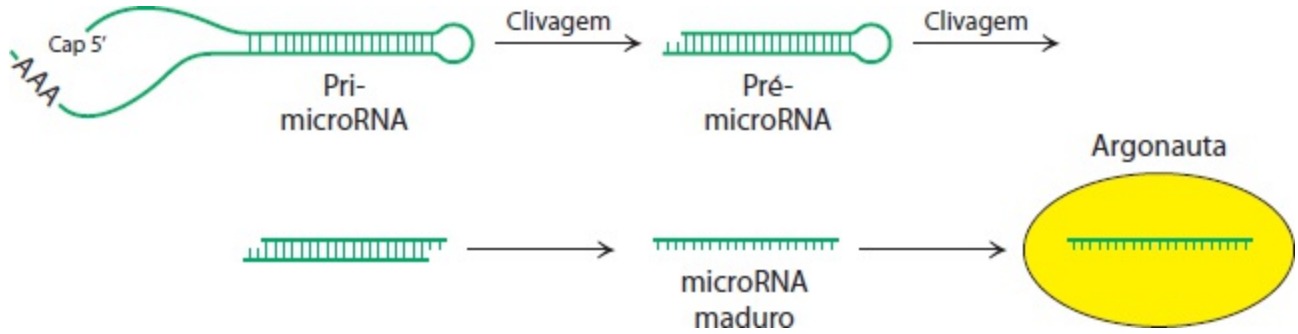


Figura 29.32 Produção de RNA regulador pequeno. Uma via a partir de um produto de transcrição, incluindo um microRNA, até o microRNA maduro ligado a uma proteína Argonauta. O produto de transcrição inicial, um pri-microRNA, é inicialmente clivado a um RNA pequeno de fita dupla, denominado pré-microRNA. Uma das fitas do pré-microRNA, o microRNA maduro, é então ligada por uma proteína Argonauta.

A edição do RNA modifica as proteínas codificadas pelo mRNA

De modo notável, a informação de sequências de aminoácidos codificada por alguns mRNA é alterada após a transcrição. A *edição do RNA (RNA editing)* é o termo empregado para referir-se a uma mudança na sequência de nucleotídios do RNA após transcrição por outros processos distintos do *splicing* do RNA. A edição do RNA é proeminente em alguns sistemas já discutidos. A *apolipoproteína B* (apo B) desempenha um papel importante no transporte de triacilgliceróis e colesterol, formando uma camada esférica anfipática ao redor dos lipídios transportados em partículas de lipoproteína (Seção 26.3). A apo B existe em duas formas, uma *apo B-100 de* 512 kDa e uma *apo B-48 de* 240 kDa. A forma maior, que é sintetizada pelo fígado, participa no transporte de lipídios sintetizados na célula. A forma menor, sintetizada pelo intestino delgado, transporta a

gordura alimentar na forma de quilomícrons. A apo B-48 contém os 2.152 resíduos N-terminais da apo B-100 de 4.536 resíduos. Essa molécula truncada pode formar partículas de lipoproteína, mas não pode ligar-se ao receptor de lipoproteínas de baixa densidade nas superfícies celulares. Qual é a relação entre essas duas formas de apo B? Experimentos revelaram a atuação de um mecanismo totalmente inesperado para a geração de diversidade: *a mudança da sequência de nucleotídios do mRNA após a sua síntese* (Figura 29.33). *Um resíduo específico de citidina do mRNA é desaminado a uridina, o que altera o códon no resíduo 2.153 de CAA (Gln) para UAA (terminação)*. A desaminase que catalisa essa reação está presente no intestino delgado, mas não no fígado, e só expressa em determinados estágios de desenvolvimento.

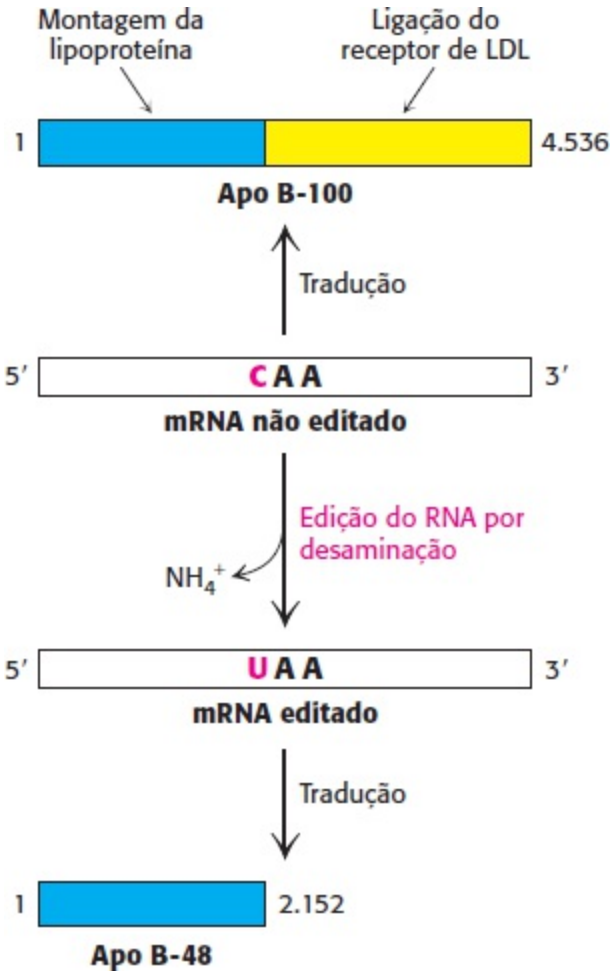


Figura 29.33 Edição do RNA. A desaminação enzimática de um resíduo específico de citidina no mRNA para a apolipoproteína B-100 modifica um códon de glutamina (CAA) para um códon de terminação (UAA). A apolipoproteína B-48, uma versão truncada da proteína que carece do domínio de ligação do receptor de LDL, é gerada por essa modificação pós-transcricional na sequência do mRNA. [De P. Hodges and J. Scott. *Trends Biochem. Sci.* 17:77, 1992.]

A edição do RNA não se limita à apolipoproteína B. O glutamato abre canais específicos de cátions no sistema nervoso central de vertebrados, ligando-se a receptores nas membranas pós-sinápticas. A edição do RNA modifica um único códon de glutamina (CAG) no mRNA para o receptor de glutamato para o códon de arginina (lido como CGG). A substituição de Gln por Arg no receptor impede o fluxo de Ca^{2+}, mas não de Na^+ pelo canal.

A edição do RNA provavelmente é muito mais comum do que se acreditava anteriormente. A reatividade química das bases de nucleotídios, incluindo a suscetibilidade à desaminação que necessita de complexos mecanismos de reparo de DNA, tem sido aproveitada como mecanismo para

geração da diversidade molecular no RNA e, portanto, nos níveis de proteínas.

Nos tripanossomos (protozoários parasitos), um tipo diferente de edição de RNA modifica acentuadamente vários mRNA mitocondriais. Quase metade dos resíduos de uridina nesses mRNA são inseridos por edição do RNA. *Uma molécula guia de RNA* identifica as sequências a serem modificadas, e uma *cauda poli(U)* do guia doa resíduos de uridina aos mRNA que estão sofrendo edição. Evidentemente, as sequências de DNA nem sempre revelam fielmente a sequência de proteínas codificadas: podem ocorrer mudanças funcionais cruciais no mRNA.

As sequências nas extremidades dos íntrons especificam sítios de *splicing* nos precursores de mRNA

Os genes nos eucariotos superiores são compostos, em sua maioria, de éxons e íntrons (Seção 4.7). Os íntrons precisam ser excisados, enquanto os éxons devem ser ligados para formar o mRNA final, em um processo denominado *splicing* do RNA. Esse *splicing* deve ser extremamente sensível: a ocorrência de *splicing* um nucleotídio acima ou abaixo do local pretendido criaria um deslocamento de um nucleotídio, o que alteraria a fase de leitura no lado 3′ do *splicing*, produzindo uma sequência de aminoácidos totalmente diferente, incluindo, provavelmente, um códon prematuro de interrupção. Por conseguinte, o local correto de *splicing* precisa ser claramente marcado. Uma determinada sequência indica o sítio de *splicing?* São conhecidas as sequências de milhares de junções íntron-éxon dentro de transcritos de RNA. Nos eucariotos, desde leveduras a mamíferos, essas sequências apresentam um tema estrutural comum: o *íntron começa com GU e termina com AG*. A sequência de consenso no *splicing* 5′ nos vertebrados é AGGUAAGU, em que GU é invariável (Figura 29.34). Na extremidade 3′ de um íntron, a sequência de consenso é um segmento de *10 pirimidinas* (U ou C; denominado *trato de polipirimidina*), seguido de qualquer base e, então, de C, terminando com AG invariável. Os íntrons também apresentam um importante sítio interno, localizado entre 20 e 50 nucleotídios a montante ao sítio de *splicing* 3′; é denominado *sítio de ramificação*, por motivos que serão logo evidentes. Nas leveduras, a sequência do sítio de ramificação é quase sempre UACUAAC, ao passo que, nos mamíferos, são encontradas diversas sequências.

Os sítios de *splicing* 5′ e 3′ e o sítio de ramificação são essenciais para determinar onde ocorre o *splicing*. Mutações em cada uma dessas três regiões críticas levam a um *splicing* aberrante. Os íntrons variam de tamanho, de 50 a 10.000 nucleotídios, de modo que o mecanismo de *splicing* tem que encontrar o sítio 3′ a uma distância de vários milhares de nucleotídios. Sequências específicas próximas aos sítios de *splicing* (tanto nos íntrons quanto nos éxons) desempenham um papel importante na regulação do *splicing*, particularmente na designação de sítios de *splicing*, quando existem muitas alternativas (p. 884). Na atualidade, os pesquisadores estão procurando determinar os fatores que contribuem para a seleção de sítios de *splicing* para mRNA individuais. Apesar de nosso conhecimento das sequências de sítios de *splicing*, a previsão dos pré-mRNA e de seus produtos proteicos a partir da informação da sequência do DNA genômico continua sendo um desafio.

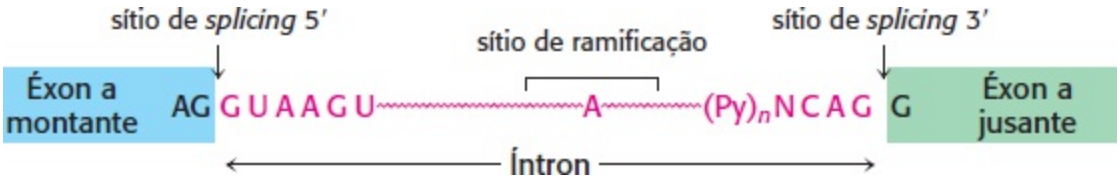


Figura 29.34 Sítios de *splicing*. São mostradas as sequências de consenso para os sítios de *splicing* 5′ e 3′. Py refere-se

à pirimidina.

O *splicing* consiste em duas reações sequenciais de transesterificação

O *splicing* de moléculas nascentes de mRNA é um processo complicado. Requer a cooperação de vários RNA pequenos e proteínas, que formam um grande complexo denominado spliceossomo. Entretanto, a química do processo de *splicing* é simples. O *splicing* começa com a clivagem da ligação fosfodiéster entre o éxon a montante (éxon 1) e a extremidade 5′ do íntron (Figura 29.35). O grupo de ataque nessa reação é o grupo 2′-OH de um resíduo de adenilato no sítio de ramificação. Forma-se uma ligação fosfodiéster 2′-5′ entre esse resíduo A e o fosfato 5′ terminal do íntron. Essa reação é uma transesterificação

Observe que esse resíduo de adenilato também está unido a dois outros nucleotídios por ligações fosfodiéster 3′-5′ normais (Figura 29.36). Por conseguinte, há formação de uma *ramificação* nesse local, e obtém-se um *laço intermediário*.

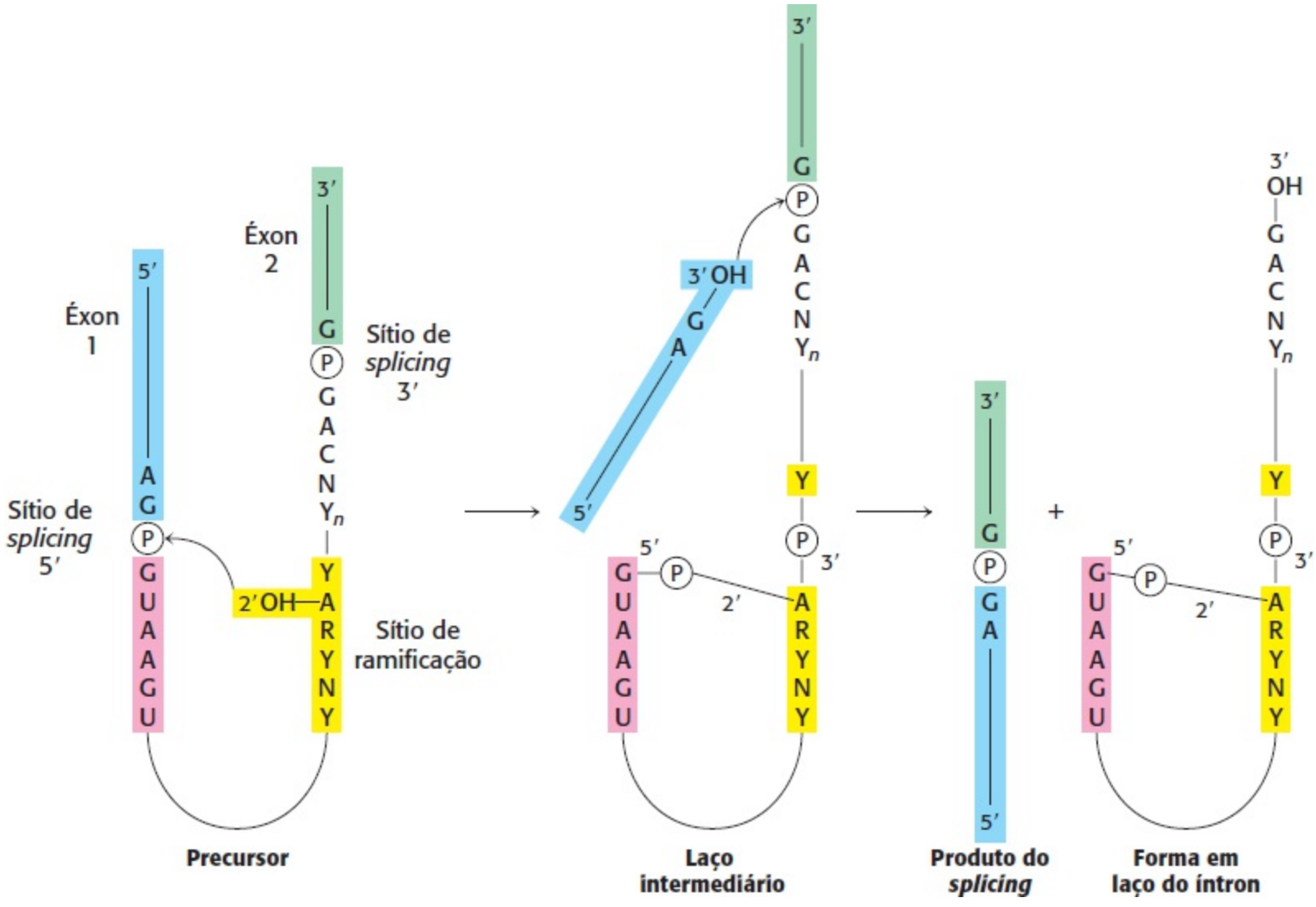


Figura 29.35 Mecanismo de *splicing* usado para precursores do mRNA. O éxon a montante (5) é mostrado em azul; o éxon a jusante (3), em verde, e o sítio de ramificação, em amarelo. Y representa um nucleotídio de pirimidina, R indica um

nucleotídio de purina, e N, qualquer nucleotídio. O sítio de *splicing* 5′ é atacado pelo grupo 2′-OH do resíduo de adenosina do sítio de ramificação. O sítio de *splicing* 3′ é atacado pelo grupo 3′-OH recém-formado do éxon a montante. Os éxons são unidos, e o íntron é liberado na forma de um laço. [De P.A. Sharp. *Cell* 42:397-408, 1985.]

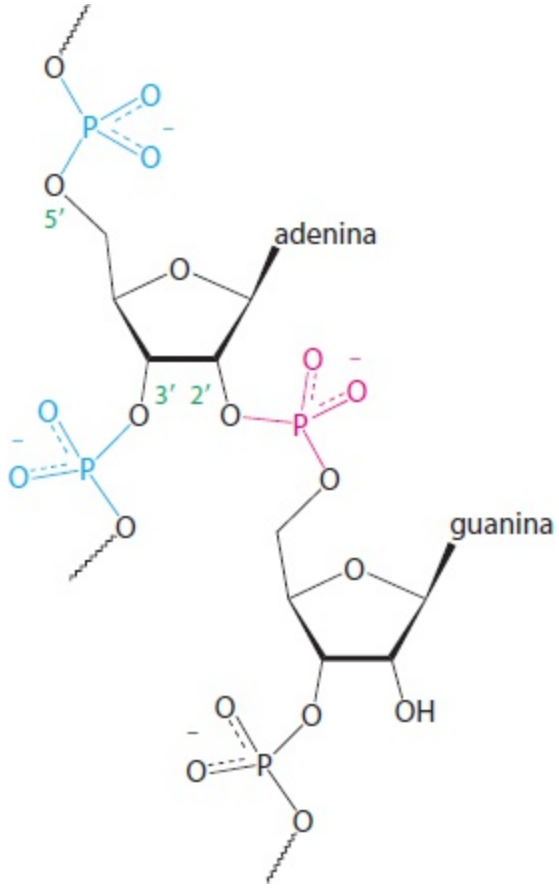


Figura 29.36 Ponto de ramificação do *splicing*. A estrutura do ponto de ramificação no laço intermediário em que o resíduo de adenilato é unido a três nucleotídios por ligações fosfodiéster. A nova ligação 2′ a 5′ é mostrada em vermelho, enquanto as ligações 3′ a 5′ habituais são mostradas em azul.

O 3′-OH terminal do éxon 1 ataca, então, a ligação fosfodiéster entre o íntron e o éxon 2. Os éxons 1 e 2 tornam-se unidos, e o íntron é liberado na forma de laço. Novamente, essa reação é uma transesterificação. Por conseguinte, o *splicing* é efetuado por duas *reações de transesterificação*, e não por hidrólise seguida de ligação. A primeira reação produz um grupo 3′-OH livre na extremidade 3′ do éxon 1, enquanto a segunda reação liga esse grupo ao fosfato 5′ do éxon 2. *O número de ligações fosfodiéster permanece o mesmo durante essas etapas*, e esse fato é de suma importância visto que possibilita a ocorrência da própria reação de *splicing* sem uma fonte de energia, como ATP ou GTP.

Os RNA nucleares pequenos nos spliceossomos catalisam o *splicing* dos precursores de mRNA

O núcleo contém muitos tipos de moléculas de RNA pequenas com menos de 300 nucleotídios, designadas como RNA nucleares pequenos (*snRNA, do inglês small nuclear RNAs*). Alguns deles – designados como U1, U2, U4, U5 e U6 – são essenciais para o *splicing* de precursores de mRNA. As estruturas secundárias desses RNA são altamente conservadas nos organismos, desde leveduras a seres humanos. Essas moléculas de RNA estão associadas a proteínas específicas, formando complexos denominados partículas de ribonucleoproteínas nucleares pequenas (*snRNP, do inglês*

small nuclear ribonucleoprotein particles). Os pesquisadores frequentemente as designam como "*snurps*". Os spliceossomos são grandes montagens (60S) dinâmicas, compostas de snRNP, centenas de outras proteínas denominadas *fatores de splicing* e os precursores dos mRNA em fase de processamento (Tabela 29.3).

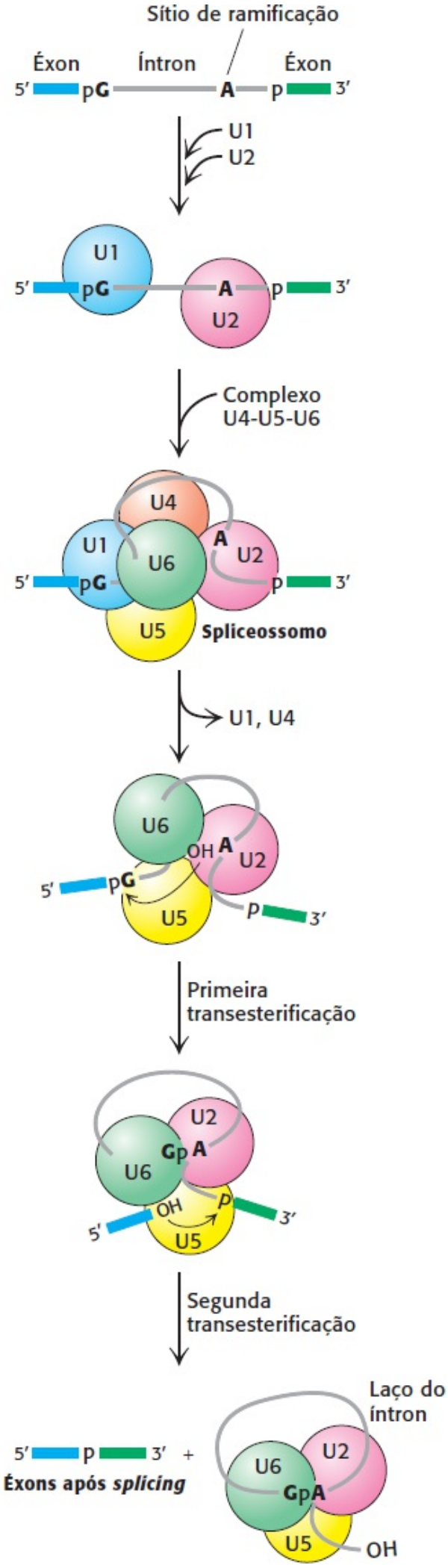
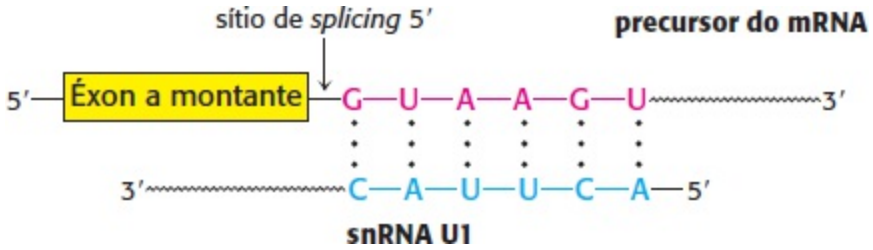

Sítio de ramificação
Éxon
Íntron
Éxon
5′ pG A p 3′
U1
U2
U1
5′ pG A p 3′
U2
Complexo
U4-U5-U6
U4
U1
U6
A
U2
5′ pG p 3′
U5
Spliceossomo
U1, U4
U6
OH A
U2
5′ pG
U5
p 3′
Primeira
transesterificação
U2
U6
Gp A
OH
p
3′
5′
U5
Segunda
transesterificação
Laço do
íntron
5′ p 3′ +
Éxons após splicing
U6
U2
GpA
U5
OH

Figura 29.37 Montagem e ação do spliceossomo. U1 liga-se ao sítio de *splicing* 5′, enquanto U2 liga-se ao ponto de ramificação. Em seguida, um complexo pré-formado U4-U5-U6 junta-se à montagem para formar o spliceossomo completo. O snRNA U6 dobra-se novamente e liga-se ao sítio de *splicing* 5′, deslocando U1. U4 é deslocado por interações extensas entre U6 e U2. Em seguida, na primeira etapa de transesterificação, a adenosina do sítio de ramificação ataca o sítio de *splicing* 5′, fazendo um laço intermediário. U5 mantém os dois éxons em estreita proximidade, e ocorre a segunda transesterificação, com ataque do sítio de *splicing* 3′ pelo grupo hidroxila do sítio de *splicing* 5′. Essas reações resultam no mRNA maduro, e forma-se um laço do íntron ligado por U2, U5 e U6. [De T. Villa, J. A. Pleiss and C. Guthrie, *Cell* 109:149-152, 2002.]

Nas células de mamíferos, o *splicing* começa com o reconhecimento do sítio de *splicing* 5′ pela snRNP U1 (Figura 29.37). O snRNA U1 contém uma sequência altamente conservada de seis nucleotídios, não coberta por proteína no snRNP, que faz pares de bases com o sítio de *splicing* 5′ do pré-mRNA. Essa ligação inicia a montagem do spliceossomo na molécula de pré-mRNA.

Tabela 29.3 Partículas de ribonucleoproteínas nucleares pequenas (snRNP) no *splicing* de precursores de mRNA

snRNP	Tamanho do snRNA (nucleotídios)	Função
U1	165	Liga-se ao sítio de splicing 5′
U2	185	Liga-se ao sítio de ramificação e forma parte do centro catalítico
U5	116	Liga-se ao sítio de ramificação 5′ e depois ao sítio de ramificação 3′
U4	145	Mascara a atividade catalítica de U6
U6	106	Catalisa o splicing



A snRNP U2 liga-se em seguida, ao sítio de ramificação no íntron por pareamento de bases entre uma sequência altamente conservada no snRNA U2 e pré-mRNA. A ligação snRNP U2 requer hidrólise de ATP. Um conjunto de três snRNP U4-U5-U6 pré-montado junta-se a esse complexo de U1, U2 e precursor de mRNA, formando o spliceossomo. Essa associação também necessita de hidrólise de ATP.

Uma visão reveladora da interação de moléculas de RNA nessa montagem veio do exame do padrão de ligações cruzadas formadas pelo *psoraleno*, um reagente que une pirimidinas adjacentes em regiões de pareamento de bases na fototerapia. Essas ligações cruzadas sugerem que o *splicing* ocorre da seguinte maneira: em primeiro lugar, U5 interage com sequências do éxon no sítio de *splicing* 5′ e, subsequentemente, com o éxon 3′. Em seguida, U6 separa-se de U4 e sofre um rearranjo intramolecular que possibilita o pareamento de bases com U2, bem como a interação com a

extremidade 5′ do íntron, deslocando U1 do spliceossomo. A hélice U2-U6 é indispensável para o *splicing*, sugerindo que os *U2 e U6 provavelmente formam o centro catalítico do spliceossomo* (Figura 29.38). U4 atua como inibidor que mascara U6 até que ocorra alinhamento dos sítios específicos de *splicing*. Esses rearranjos resultam na primeira reação de transesterificação, clivando o éxon 5′ e produzindo o laço intermediário.

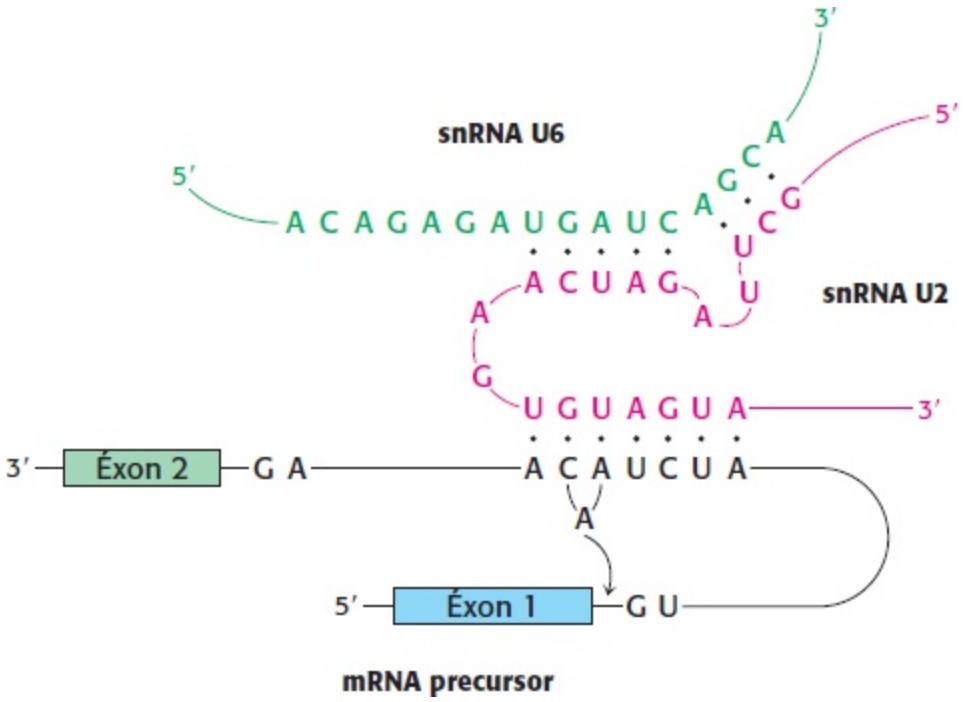


Figura 29.38 Centro catalítico do *splicing*. O centro catalítico do spliceossomo é formado por snRNA U2 (em vermelho) e snRNA U6 (em verde), que estão pareados. U2 também faz pares de bases com o sítio de ramificação do precursor do mRNA. [De H.D. Madhani e C. Guthrie. *Cell* 71:803-817, 1992.]

Outros rearranjos do RNA no spliceossomo facilitam a segunda transesterificação. Nesses rearranjos, U5 alinha o éxon 5′ livre com o éxon 3′, de modo que o grupo hidroxila 3′ do éxon 5′ fique posicionado para o ataque nucleofílico do sítio de *splicing* 3′, gerando o produto resultante do *splicing*. U2, U5 e U6 ligados ao laço de íntron excisado são liberados para completar a reação de *splicing*.

Muitas das etapas no processo de *splicing* necessitam da hidrólise do ATP. Como a energia livre associada à hidrólise do ATP é usada para acionar o *splicing*? Para obter os rearranjos bem ordenados necessários para o *splicing*, RNA helicases acionadas por ATP devem desenrolar as hélices de RNA e possibilitar a formação de arranjos alternativos de pares de bases. Por conseguinte, duas características do processo de *splicing* são notáveis. Na primeira, *as moléculas de RNA desempenham papéis essenciais ao direcionarem o alinhamento de sítios de splicing e efetuarem a catálise*. Na segunda, *helicases acionadas por ATP desenrolam intermediários de RNA dúplex, o que facilita a catálise e induz a liberação de snRNP do mRNA.*

A transcrição e o processamento do mRNA são acoplados

Embora a transcrição e o processamento dos mRNA tenham sido descritos aqui como eventos separados na expressão gênica, há evidências experimentais de que essas duas etapas sejam coordenadas pelo domínio carboxiterminal da RNA polimerase II. Vimos que o CTD é constituído de uma sequência singular repetida de sete aminoácidos, YSPTSPS. S_2 ou S_5, ou ambos, podem ser

fosforilados nas várias repetições. O estado de fosforilação do CTD é controlado por várias quinases e fosfatases e leva o CTD a ligar-se a muitas das proteínas que desempenham papéis na transcrição e no processamento do RNA. O CTD contribui para a transcrição eficiente, recrutando essas proteínas para o pré-mRNA (Figura 29.39), incluindo:

1. enzimas que adicionam o cap, que metilam a guanina 5′ no pré-mRNA imediatamente após o início da transcrição;

2. componentes da maquinaria do *splicing*, que iniciam a excisão de cada íntron à medida que é sintetizado; e

3. uma endonuclease que cliva o transcrito no sítio de adição de poli(A), criando um grupo 3′-OH livre, que constitui o alvo de adenilação 3′.

Esses eventos ocorrem de modo sequencial, dirigidos pelo estado de fosforilação do CTD.

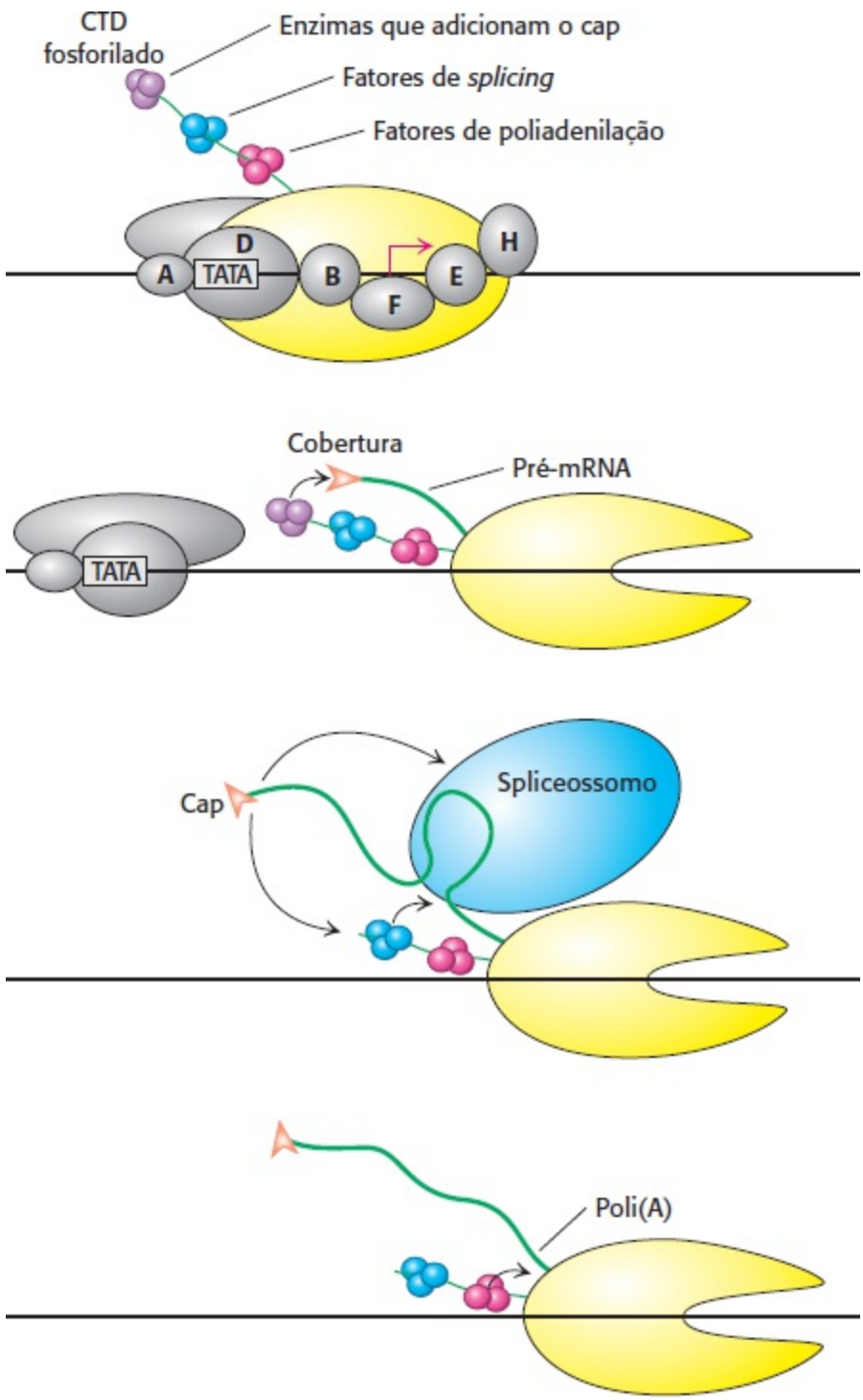


Figura 29.39 CTD: acoplamento da transcrição ao processamento de pré-mRNA. O fator de transcrição TFIIH fosforila o domínio carboxiterminal (CTD) da RNA polimerase II, sinalizando a transição da iniciação da transcrição para o alongamento. O CTD fosforilado liga-se a fatores necessários para a adição de um cap, o *splicing* e a poliadenilação do pré-mRNA. Essas proteínas são colocadas em estreita proximidade com seus locais de ação no pré-mRNA nascente, à medida que são transcritas durante o alongamento. [De P. A. Sharp. *TIBS* 30:279-281, 2005.]

As mutações que afetam o *splicing* do pré-mRNA causam doença

As mutações no pré-mRNA (ação em cis) ou nos fatores de *splicing* (ação em trans) podem causar *splicing* defeituoso do pré-mRNA. As mutações no pré-mRNA causam algumas formas de talassemias, um grupo de anemias hereditárias caracterizadas pela síntese defeituosa de hemoglobina (Seção 7.4). As mutações de ação cis que causam *splicing* aberrante podem ocorrer nos sítios de *splicing* 5′ ou 3′ em qualquer um dos dois íntrons da cadeia β da hemoglobina ou em seus éxons. As mutações resultam habitualmente em *splicing* incorreto do pré-mRNA que, em virtude de

um códon de terminação prematura, torna-se incapaz de codificar uma proteína completa. O mRNA defeituoso é normalmente degradado, em lugar de ser traduzido. As mutações no sítio de *splicing* 5′ podem alterar esse sítio, de modo que a maquinaria de *splicing* não pode reconhecêlo, forçando o mecanismo a encontrar outro sítio de *splicing* 5′ no íntron e a introduzir o potencial de um códon de terminação prematura. As mutações no próprio íntron podem criar um novo sítio de *splicing* 5′; nesse caso, qualquer um dos dois sítios de *splicing* pode ser reconhecido (Figura 29.40). Em consequência, alguma proteína normal pode ser sintetizada, de modo que a doença é menos grave. *Foi estimado que as mutações que afetam o splicing causam pelo menos 15% de todas as doenças genéticas*.

As mutações causadoras de doenças também podem aparecer nos fatores de *splicing*. A retinite pigmentosa é uma doença de cegueira adquirida, descrita pela primeira vez em 1857, com incidência de 1/3.500. Cerca de 5% da forma autossômica dominante de retinite pigmentosa são provavelmente causados por mutações na proteína hPrp8, um fator de *splicing* do pré-mRNA, que é um componente da tri-snRNP U4-U5-U6. Ainda não foi esclarecido como uma mutação em um fator de *splicing* presente em todas as células provoca doença apenas na retina; todavia, a retinite pigmentosa fornece um bom exemplo de como as mutações que perturbam a função do espliceossomo podem causar doença.

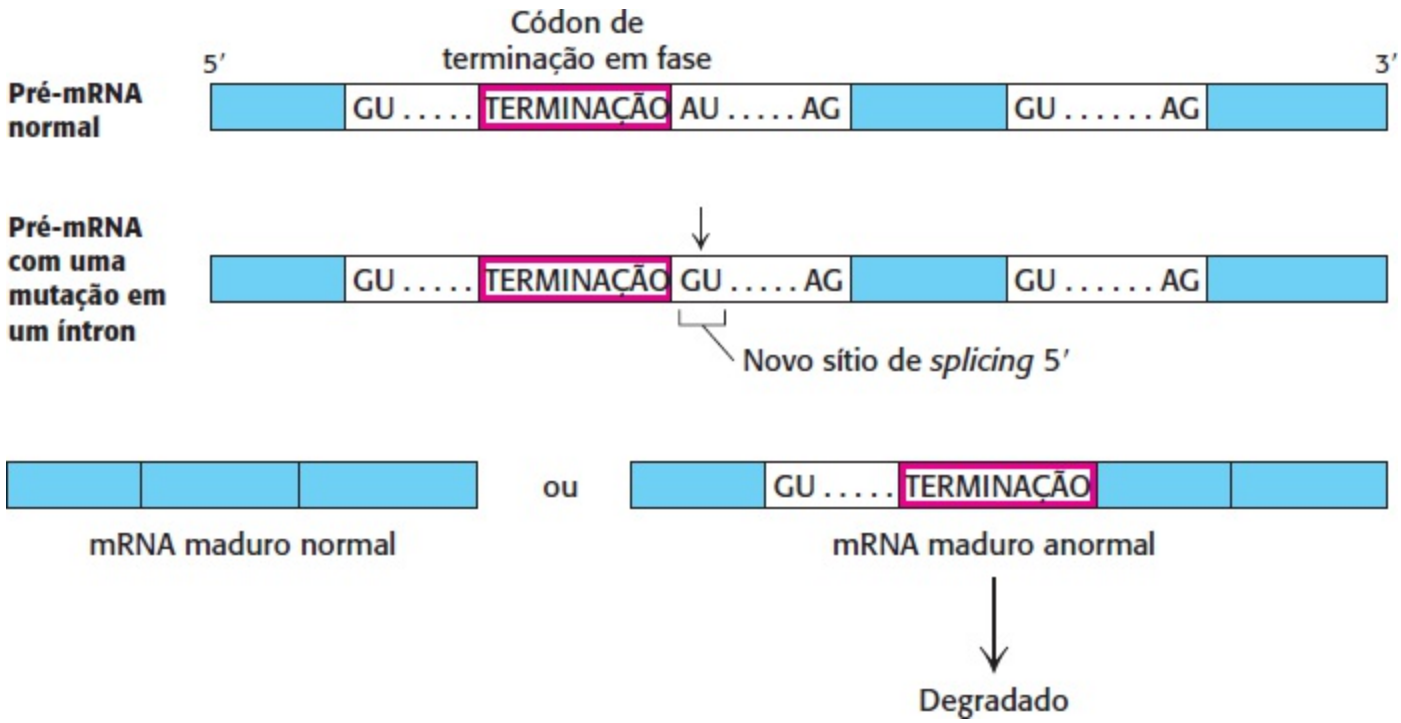


Figura 29.40 Uma mutação de *splicing* que causa talassemia. Uma mutação de A para G dentro do primeiro íntron do gene para a cadeia β da hemoglobina humana cria um novo sítio de *splicing* 5′ (GU). Ambos os sítios de *splicing* 5′ são reconhecidos pela snRNP U1; por conseguinte, o *splicing* pode algumas vezes criar um mRNA maduro normal e um mRNA maduro anormal que contém sequências do íntron. O mRNA maduro normal é traduzido em cadeia β da hemoglobina. Como ele inclui sequências do íntron, o mRNA maduro anormal apresenta um códon de interrupção prematuro e é degradado.

A maioria dos pré-mRNA humanos pode sofrer *splicing* de modos alternativos, produzindo proteínas diferentes

O *splicing alternativo* é um mecanismo disseminado para gerar diversidade proteica. Diferentes combinações de éxons do mesmo gene podem sofrer *splicing* em um RNA maduro, produzindo

formas distintas de uma proteína em tecidos específicos, estágios de desenvolvimento ou vias de sinalização. O que controla os sítios de *splicing* a serem selecionados? A seleção é determinada pela ligação de fatores de *splicing* de ação trans a sequências de ação cis no pré-mRNA. A maioria dos *splicing* alternativos leva a mudanças na sequência codificante, resultando em proteínas com funções diferentes. *O splicing alternativo fornece um poderoso mecanismo para expandir a versatilidade das sequências genômicas por meio do controle combinatório*. Considere um gene com cinco posições nas quais pode ocorrer *splicing*. Partindo da pressuposição de que essas vias de *splicing* alternativo podem ser reguladas independentemente, é possível produzir um total de $2^5 = 32$ mRNA diferentes.

O sequenciamento do genoma humano revelou que a maioria dos pré-mRNA sofre *splicing* alternativo, levando a um maior número de proteínas do que seria previsto pelo número de genes. Um exemplo de *splicing* alternativo que leva à expressão de duas proteínas diferentes, cada uma em um tecido diferente, é fornecido pelo gene que codifica a calcitonina e o peptídio relacionado com o gene da calcitonina (CGRP, *do inglês calcitonin-gene-related peptide*; Figura 29.41). Na glândula tireoide, a inclusão do éxon 4 em uma via de *splicing* produz a calcitonina, um hormônio peptídico que regula o metabolismo do cálcio e do fósforo. Nas células neuronais, a exclusão do éxon 4 em outra via de *splicing* produz o CGRP, um hormônio peptídico que atua como vasodilatador. Por conseguinte, um único pré-mRNA produz dois hormônios peptídicos diferentes, dependendo do tipo de célula. Nesse caso, apenas duas proteínas resultam do *splicing* alternativo. Todavia, em outros casos, uma quantidade muito maior de proteínas pode ser produzida. Um exemplo extremo é o pré-mRNA de *Drosophila*, que codifica DSCAM, uma proteína neuronal que afeta a conectividade dos axônios. O *splicing* alternativo desse pré-mRNA tem o potencial de produzir 38.016 combinações diferentes de éxons, um número maior do que o número total de genes no genoma de *Drosophila*. Entretanto, apenas uma fração desses mRNA potenciais parece ser produzida, devido a mecanismos reguladores que ainda não estão bem elucidados. Várias doenças humanas que podem ser atribuídas a defeitos no *splicing* alternativo estão listadas na Tabela 29.4. A maior compreensão do *splicing* alternativo e dos mecanismos de seleção dos sítios de *splicing* será crucial para compreender como o proteoma é representado pelo genoma humano.

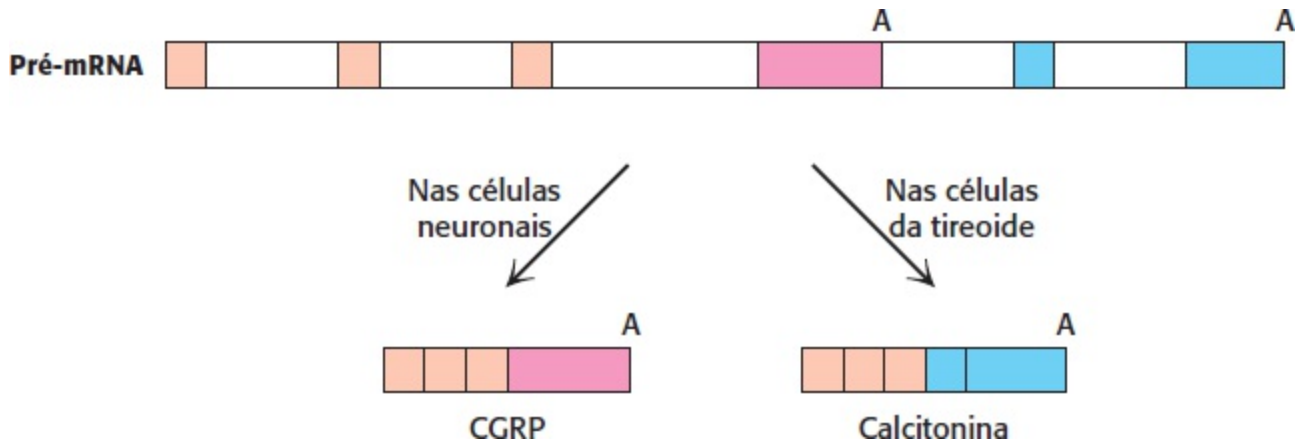


Figura 29.41 Um exemplo de *splicing* alternativo. Nos seres humanos, são produzidos dois hormônios muito diferentes a partir de um único pré-mRNA de calcitonina/CGRP. O *splicing* alternativo produz o mRNA maduro para calcitonina ou CGRP (peptídio relacionado com o gene de calcitonina), dependendo do tipo de célula no qual o gene é expresso. Cada transcrito alternativo incorpora um dos dois sinais alternativos de poliadenilação (A) presentes no pré-mRNA.

Tabela 29.4 Doenças humanas selecionadas atribuídas a defeitos no *splicing* alternativo.

Distúrbio	Gene ou seu produto
Porfiria intermitente aguda	Porfobilinogênio desaminase
Câncer de mama e ovário	*BRCA1*
Fibrose cística	CFTR
Demência frontotemporal	Proteína τ
Hemofilia A	Fator VIII
Deficiência de HGPRT (síndrome de Lesch-Nyhan)	Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase
Encefalomielopatia de Leigh	Piruvato desidrogenase E1α
Imunodeficiência combinada grave	Adenosina desaminase
Atrofia do músculo espinal	*SMN1* ou *SMN2*

29.4 A descoberta do RNA catalítico foi reveladora em relação ao mecanismo e à evolução

Os RNA formam uma classe surpreendentemente versátil de moléculas. Conforme já assinalado, o *splicing* é catalisado, em grande parte, por moléculas de RNA, enquanto as proteínas desempenham um papel secundário. Outra enzima que contém um componente essencial de RNA é a ribonuclease P, que catalisa a maturação do tRNA por clivagem endonucleolítica de nucleotídios a partir da extremidade 5′ da molécula precursora. Por fim, como veremos no Capítulo 30, o componente de RNA dos ribossomos é o catalisador que efetua a síntese de proteínas.

A versatilidade do RNA pela primeira vez tornou-se clara com observações do processamento do RNA ribossômico em um eucarioto unicelular. No *Tetrahymena* (um protozoário ciliado), um íntron de 414 nucleotídios é removido de um precursor de 6,4 kb, produzindo a molécula madura de rRNA 26S (Figura 29.42). Em uma série importante de estudos dessa reação de *splicing*, Thomas Cech e seus colaboradores estabeleceram que o próprio RNA fez o seu *splicing* para eliminar precisamente o íntron. Esses experimentos notáveis demonstraram que uma molécula de RNA pode efetuar o seu *próprio splicing* na ausência de proteína. Com efeito, o RNA isolado é catalítico e, em certas condições, constitui portanto uma *ribozima*. Desde então, foram encontrados mais de 1.500 íntrons semelhantes em espécies amplamente diversas, como bactérias e eucariotos, mas não em vertebrados. Em seu conjunto, são designados como *íntrons do grupo 1*.

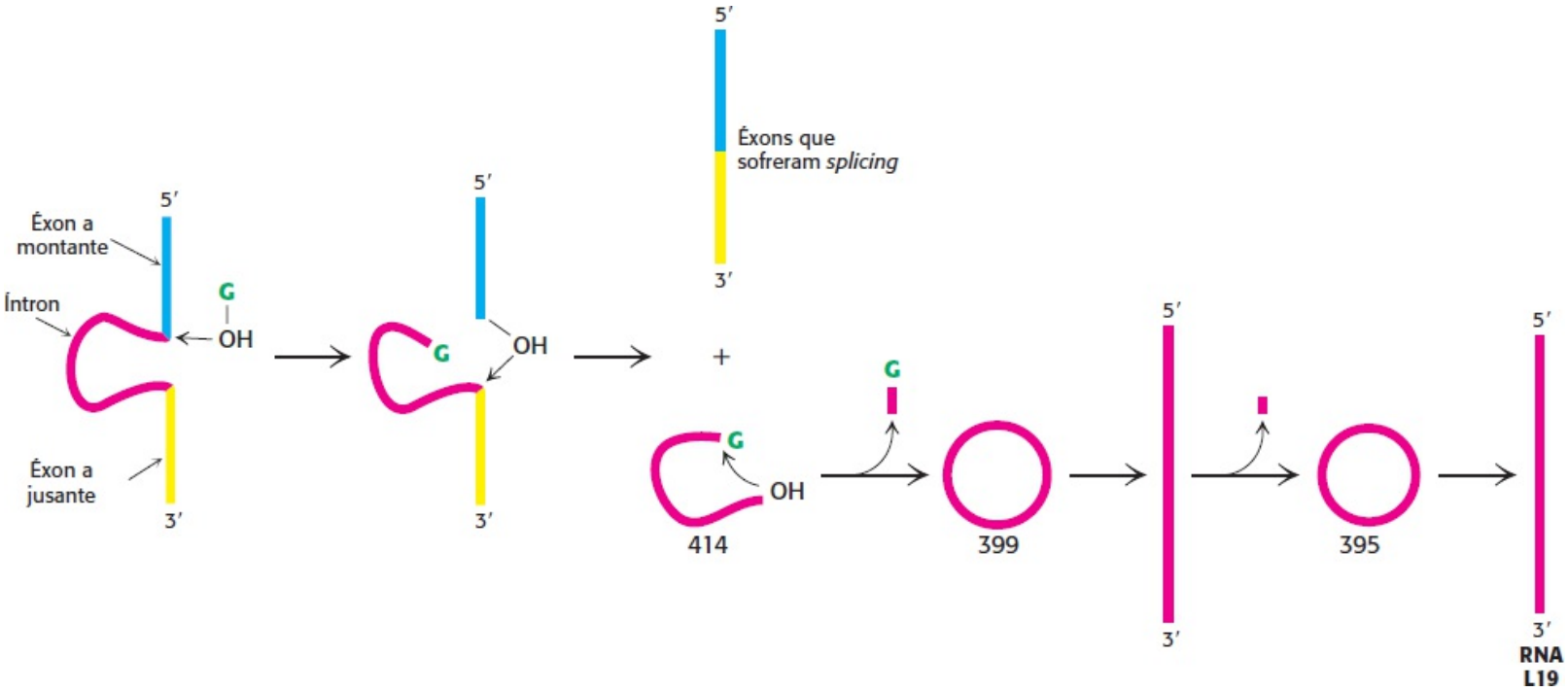


Figura 29.42 *Auto-splicing*. Um precursor de RNA ribossômico de *Tetrahymena*, representativo dos íntrons de grupo I, sofre *auto-splicing* na presença de um cofator de guanosina (G, mostrado em verde). Um íntron de 414 nucleotídios (em vermelho) é liberado na primeira reação de *splicing*. Em seguida, esse íntron sofre auto-*splicing* mais duas vezes, produzindo um RNA linear que perdeu um total de 19 nucleotídios. Esse RNA L19 é cataliticamente ativo. [De T. Cech. RNA as an enzyme. Copyright © 1986 by Scientific American, Inc. Todos os direitos reservados.]

A reação de *auto-splicing* no íntron de grupo I requer a adição de um nucleotídio de guanosina. Originalmente, foram incluídos nucleotídios na mistura da reação, visto que se acreditava que o ATP ou o GTP pudessem ser necessários como fonte de energia. Na verdade, foi constatado que os nucleotídios eram necessários como cofatores. O cofator necessário demonstrou ser uma unidade de guanosina, na forma de guanosina, GMP, GDP ou GTP. G (indicando qualquer uma dessas espécies) não atua como fonte de energia, mas sim como um grupo de ataque que se incorpora transitoriamente ao RNA (Figura 29.42). G liga-se ao RNA e, a seguir, ataca o sítio de *splicing* 5′, formando uma ligação fosfodiéster com a extremidade 5′ do íntron. Essa reação de transesterificação gera um grupo 3′-OH na extremidade do éxon a montante. Esse grupo 3′-OH recém-ligado ataca, em seguida, o sítio de *splicing* 3′. Essa segunda reação de transesterificação une os dois éxons e leva à liberação do íntron de 414 nucleotídios.

Figura 29.43 Estrutura de um íntron que faz auto-*splicing*. A estrutura de um grande fragmento do íntron de auto-*splicing* de *Tetrahymena* revela um complexo padrão de enovelamento de hélices e alças. As bases são mostradas em verde, A; amarelo, C; violeta, G; e laranja, U. [Desenhada a partir de 1GRZ.pdb.]

O auto-*splicing* depende da integridade estrutural do precursor de RNA. Grande parte do íntron de grupo I é necessária para o auto-*splicing*. Essa molécula, como muitos RNA, tem uma estrutura dobrada, formada por numerosas hastes e alças em dupla-hélice (Figura 29.43), com uma bolsa bem definida para a ligação da guanosina. O exame da estrutura tridimensional de um íntron de grupo I cataliticamente ativo, determinada por cristalografia de raios X, revela a coordenação dos íons magnésio no sítio ativo, análoga àquela observada em enzimas proteicas, como a DNA polimerase.

A análise da sequência de bases do precursor de rRNA sugeriu que os sítios de *splicing* estão alinhados com os resíduos catalíticos por pareamento de bases entre a *sequência guia interna* (IGS, *do inglês internal guide sequence*) no íntron e nos éxons 5′ e 3′ (Figura 29.44). A IGS une inicialmente o cofator de guanosina e o sítio de *splicing* 5′, de modo que o grupo 3′-OH de G possa efetuar um ataque nucleofílico ao átomo de fósforo nesse sítio de *splicing*. Em seguida, a IGS mantém o éxon a jusante em posição para ataque pelo grupo 3′-OH recém-formado do éxon a montante. Forma-se uma ligação fosfodiéster entre dois éxons, e o íntron é liberado como molécula linear. À semelhança da catálise por enzimas proteicas, a autocatálise da formação e quebra de ligações nesse precursor de rRNA é altamente específica.

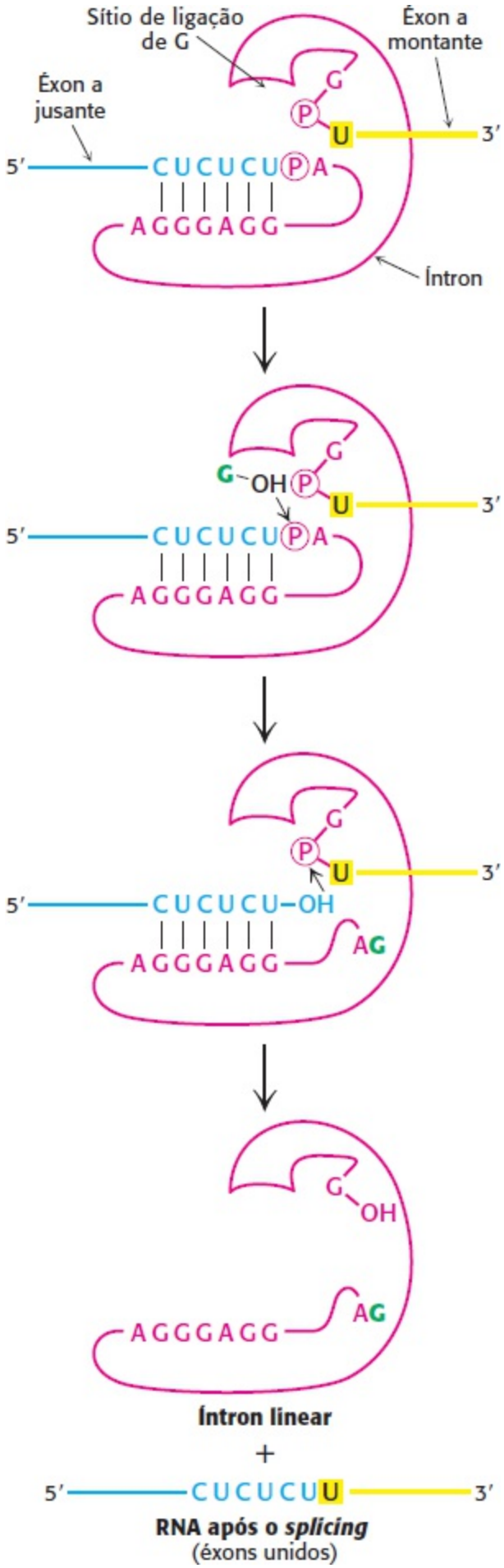


Figura 29.44 Mecanismo de auto-*splicing*. O mecanismo catalítico do íntron de grupo I inclui uma série de reações de transesterificação [De T. Cech. RNA as an enzyme. Copyright © 1986 by Scientific American, Inc. Todos os direitos reservados.]

A descoberta de atividade enzimática no íntron de auto-*splicing* e no componente de RNA da RNase P abriu novas áreas de pesquisa e mudou o modo pelo qual pensamos acerca da evolução molecular. Conforme assinalado em um capítulo anterior, a descoberta de que o RNA pode ser um catalisador, bem como um carreador de informações, sugere que pode ter existido um mundo de RNA no início da evolução da vida, antes do aparecimento do DNA e das proteínas.

Os precursores do RNA mensageiro nas mitocôndrias de leveduras e fungos também sofrem auto-*splicing*, assim como alguns precursores de RNA nos cloroplastos de organismos unicelulares, como *Chlamydomonas*. As reações de auto-*splicing* podem ser classificadas de acordo com a natureza da unidade que ataca o sítio de *splicing* a montante. O auto-*splicing* de grupo I é mediado por um cofator de guanosina, como em *Tetrahymena*. A fração de ataque no *splicing* de grupo II é o grupo 2′-OH de um adenilato específico do íntron (Figura 29.45).

O auto-*splicing* de grupo I e de grupo II assemelha-se ao *splicing* catalisado por spliceossomo em dois aspectos. No primeiro, na etapa inicial, um grupo hidroxila da ribose ataca o sítio de *splicing* 5′. O 3′-OH terminal recém-formado do éxon a montante ataca, então, o sítio de *splicing* 3′ para formar uma ligação fosfodiéster com o éxon a jusante. No segundo aspecto, ambas as reações são transesterificações, nas quais as frações fosfato de cada sítio de *splicing* são retidas nos produtos. O número de ligações fosfodiéster permanece constante. O *splicing* de grupo II assemelha-se ao *splicing* catalisado por spliceossomo dos precursores de mRNA em vários outros aspectos. O ataque no sítio de *splicing* 5′ é efetuado por uma parte do próprio íntron (o grupo 2′-OH da adenosina), em lugar de ser feito por um cofator externo (G). Em ambos os casos, o íntron é liberado na forma de um laço. Além disso, em alguns casos, o íntron de grupo II é transcrito em segmentos que são montados por pontes de hidrogênio ao íntron catalítico, de modo análogo à montagem dos snRNA no spliceossomo.

Essas semelhanças levaram à sugestão de que o *splicing* catalisado por spliceossomo dos precursores de mRNA evoluiu a partir do auto-*splicing* catalisado por RNA. O *splicing* de grupo II pode muito bem ser um intermediário entre o *splicing* de grupo I e aquele observado nos núcleos de eucariotos superiores. *Uma etapa importante nessa transição foi a transferência do poder catalítico do próprio íntron para outras moléculas*. A formação de spliceossomos deu aos genes uma nova liberdade, visto que os íntrons não ficavam mais restritos a fornecer o centro catalítico para o *splicing*. Outra vantagem dos catalisadores externos para o *splicing* é que eles podem ser mais prontamente regulados. Todavia, é importante assinalar que as semelhanças não estabelecem a ancestralidade. As semelhanças entre íntrons de grupo II e o *splicing* de mRNA podem ser um resultado de evolução convergente. Talvez exista apenas um número limitado de modos para efetuar a excisão eficiente e específica de íntrons. Para determinar se essas semelhanças provêm de ancestralidade ou da química, será necessário expandir nossa compreensão da bioquímica do RNA.

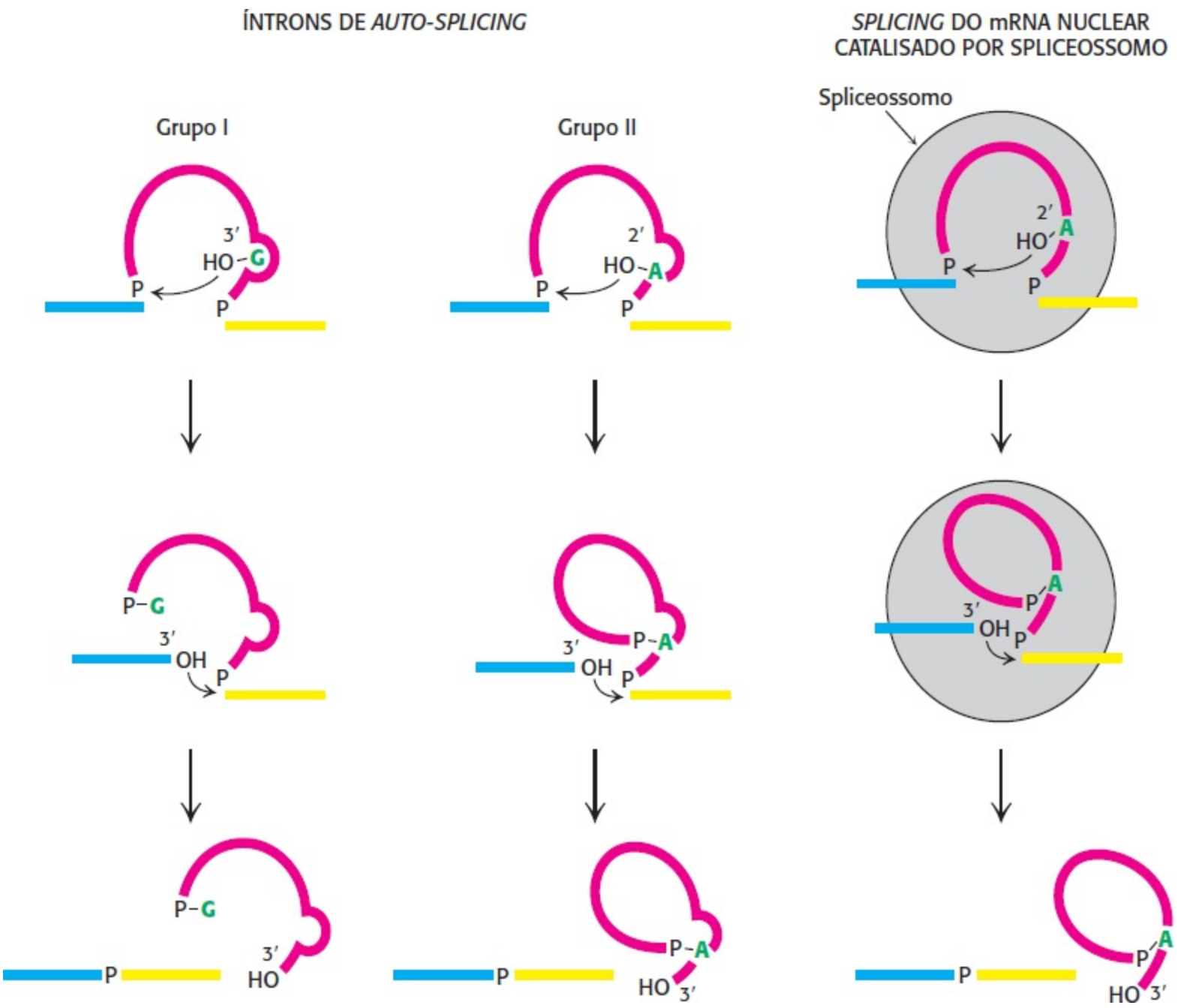


Figura 29.45 Comparação das vias de *splicing*. Os éxons que estão sendo unidos são mostrados em azul e em amarelo, enquanto a unidade de ataque é mostrada em verde. O sítio catalítico é formado pelo próprio íntron (em vermelho) no *splicing* de grupo I e grupo II. Em contrapartida, o *splicing* de precursores de mRNA nuclear é catalisado por snRNA e suas proteínas associadas no spliceossomo. [De P. A. Sharp. *Science* 235:766-771, 1987.]

Resumo

29.1 As RNA polimerases catalisam a transcrição

Todas as moléculas de RNA nas células são sintetizadas por RNA polimerases, de acordo com instruções fornecidas pelos moldes de DNA. Os monômeros substratos ativados são ribonucleosídio trifosfatos. O sentido da síntese de RNA é 5′ → 3′, como na síntese de DNA. As RNA polimerases, diferentemente das DNA polimerases, não necessitam de um iniciador (*primer*).

A RNA polimerase de *E. coli* é uma enzima com múltiplas subunidades. A composição de subunidades da holoenzima com cerca de 500 kDa é $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$, e a do cerne da enzima é $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$.

A transcrição é iniciada em sítios promotores, que são constituídos de duas sequências, uma centrada perto de –10, e a outra, perto de –35, isto é, a uma distância de 10 e 35 nucleotídios do sítio de iniciação no sentido 5′ (a montante). A sequência de consenso da região –10 é TATAAT. A subunidade faz com que a holoenzima reconheça os sítios promotores. Quando a temperatura do meio de crescimento é elevada, *E. coli* expressa uma subunidade σ especial, que se liga seletivamente ao promotor distinto dos genes de choque térmico. A RNA polimerase precisa desenrolar a dupla-hélice do molde para que ocorra transcrição. O desenrolamento expõe cerca de 17 bases na fita-molde e prepara o "palco' para a formação da primeira ligação fosfodiéster. As cadeias de RNA recém-sintetizadas começam habitualmente com pppG ou pppA. A subunidade σ dissocia-se habitualmente da holoenzima após a iniciação da cadeia nova. O alongamento ocorre em bolhas de transição, que se movem ao longo do molde de DNA, em uma velocidade de cerca de 50 nucleotídios por segundo. Em certas ocasiões, a RNA polimerase retrocede, um processo que pode facilitar a revisão do transcrito de RNA. A cadeia nascente de RNA contém sinais de terminação que finalizam a transcrição. Um sinal de terminação é um RNA em forma de grampo, seguido de vários resíduos U. Um sinal diferente de terminação é lido pela proteína *rho*, uma ATPase. Alguns genes são regulados por *riboswitches*, que consistem em estruturas que se formam em transcritos de RNA e que se ligam a metabólitos específicos. Em *E. coli*, os precursores do RNA transportador e do RNA ribossômico são clivados e modificados quimicamente após a transcrição, enquanto o RNA mensageiro é usado em sua forma inalterada como molde para a síntese de proteínas.

29.2 A transcrição nos eucariotos é altamente regulada

A síntese de RNA nos eucariotos ocorre no núcleo, enquanto a síntese de proteínas ocorre no citoplasma. Existem três tipos de RNA polimerase no núcleo: a RNA polimerase I produz precursores de RNA ribossômico; a RNA polimerase II, precursores de RNA mensageiro; e a RNA polimerase III, precursores de RNA transportador. Os promotores eucarióticos são complexos e compostos de vários elementos diferentes. Os promotores da RNA polimerase II podem estar localizados no lado 5′ ou no lado 3′ do sítio de iniciação da transcrição. Um tipo comum de promotor eucariótico consiste em uma caixa TATA centrada entre –30 e –100 e pareada com um elemento iniciador. Os elementos promotores eucarióticos são reconhecidos por proteínas denominadas fatores de transcrição, e não pela RNA polimerase II. A proteína de ligação da caixa TATA, em forma de sela, desenrola e inclina acentuadamente o DNA nas sequências da caixa TATA e atua como ponto focal para a montagem de complexos de transcrição. A proteína de ligação da caixa TATA inicia a montagem do complexo ativo de transcrição. A atividade de muitos promotores é acentuadamente aumentada por sequências amplificadoras, que não têm por si só atividade promotora. As sequências amplificadoras podem atuar a distâncias de várias quilobases e podem estar localizadas a montante ou a jusante a um gene.

29.3 Os produtos de transcrição das polimerases eucarióticas são processados

As extremidades 5′ dos precursores de mRNA tornam-se recobertas e são metiladas durante o processo de transcrição. Uma cauda poli(A) 3′ é acrescentada à maioria dos precursores de mRNA após a clivagem da cadeia nascente por uma endonuclease. Os processos de edição do

RNA alteram a sequência de nucleotídios de alguns mRNA, como o da apolipoproteína B.

O *splicing* dos precursores de mRNA é efetuado por spliceossomos, que consistem em pequenas partículas de ribonucleoproteínas nucleares. Os sítios de *splicing* nos precursores de mRNA são especificados por sequências nas extremidades dos íntrons e por sítios de ramificação perto de suas extremidades 3′. O grupo 2′-OH de um resíduo de adenosina no sítio de ramificação ataca o sítio de *splicing* 5′ para formar um laço intermediário. A 3′-OH terminal recém-produzida do éxon a montante ataca, então, o sítio de *splicing* 3′ para se unir ao éxon a jusante. Por conseguinte, o *splicing* consiste em duas reações de transesterificação, em que o número de ligações fosfodiéster permanece constante durante as reações. Os RNA nucleares pequenos nos spliceossomos catalisam o *splicing* de precursores de mRNA. Em particular, os snRNA U2 e U6 formam os centros ativos dos spliceossomos.

Os eventos no processamento pós-transcrição do mRNA são controlados pelo estado de fosforilação do domínio carboxiterminal, parte da RNA polimerase II.

29.4 A descoberta do RNA catalítico foi reveladora em relação ao mecanismo e à evolução

Algumas moléculas de RNA, como as que contêm o íntron de grupo I, sofrem auto-*splicing* na ausência de proteína. Uma versão automodificada desse íntron de rRNA apresenta uma verdadeira atividade catalítica e, portanto, é uma ribozima. O *splicing* catalisado pelo spliceossomo pode ter evoluído a partir do auto-*splicing*. A descoberta do RNA catalítico abriu uma nova visão para a exploração dos estágios iniciais da evolução molecular e das origens da vida.

Palavras-chave

auto-*splicing* (p. 886)
bolha de transcrição (p. 859)
caixa TATA (p. 872)
cap 5′ (p. 876)
cauda poli(A) (p. 877)
domínio carboxiterminal (CTD) (p. 871)
edição do RNA (p. 878)
fator de transcrição (p. 873)
amplificador (p. 875)
microRNA (p. 878)
partícula de ribonucleoproteína nuclear pequena (snRNP) (p. 881)
pré-mRNA (p. 876)
proteína *rho* (ρ) (p. 866)
ribonucleoproteína nucleolar pequena (snoRNP) (p. 876)
riboswitch (p. 866)
RNA catalítico (p. 885)
RNA nuclear pequeno (snRNA) (p. 881)
RNA polimerase (p. 858)
sequência de consenso (p. 863)

sítio promotor (p. 858)
spliceossomo (p. 880)
splicing alternativo (p. 884)
splicing do RNA (p. 878)
subunidade sigma (σ) (p. 863)
transcrição (p. 857)

Questões

1. *Complementos*. A sequência de parte de um mRNA é

5′–AUGGGGAACAGCAAGAGUGGGGCCCUGUCCAAGGAG–3′

Qual é a sequência da fita codificante do DNA? E da fita-molde de DNA?

2. *Verificando erros*. Por que a síntese de RNA não é tão cuidadosamente monitorada à procura de erros quanto o é a síntese de DNA?

3. *A velocidade não é a essência*. Por que é vantajoso que a síntese de DNA seja mais rápida do que a síntese de RNA?

4. *Sítios ativos*. As estruturas globais da RNA polimerase e da DNA polimerase são muito diferentes; contudo, seus sítios ativos exibem consideráveis semelhanças. O que essas semelhanças sugerem acerca da relação evolutiva entre essas duas enzimas importantes?

5. *Inibidor potente*. A heparina inibe a transcrição por meio de sua ligação à RNA polimerase. Que propriedades da heparina possibilitam a sua ligação tão efetiva à RNA polimerase?

6. *Imprevisível*. A proteína sigma em si não pode se ligar a promotores. Preveja o efeito de uma mutação que possibilite a ligação de σ à região –10 na ausência de outras subunidades da RNA polimerase.

7. *Sigma emperrado*. Qual seria o efeito provável de uma mutação que impedisse de se dissociar do cerne da RNA polimerase?

8. *Tempo de transcrição*. Qual é o tempo mínimo necessário para a síntese de um mRNA que codifica uma proteína de 100 kDa pela polimerase de *E. coli*?

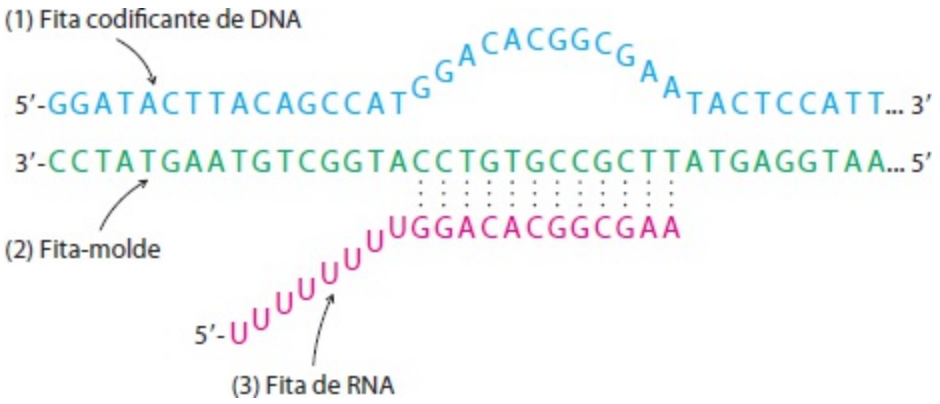
9. *Pesquisa rápida*. A RNA polimerase encontra muito rapidamente os promotores. A constante de velocidade observada para a ligação da holoenzima da RNA polimerase a sequências promotoras é de 10^{10} $M^{-1}s^{-1}$. A constante de velocidade para duas macromoléculas que se encontram é tipicamente de 10^{8} $M^{-1}s^{-1}$. Proponha uma explicação para a velocidade 100 vezes maior para uma proteína encontrar um sítio específico ao longo de uma molécula de DNA.

10. *Onde começar?* Identifique o provável sítio de iniciação da transcrição na sequência seguinte de DNA:

5′–GCCGTTGACACCGTTCGGCGATCGATCCGCTATAATGTGTGGATCCGCTT–3′
5′–CGGCAACTGTGGCAAGCCGCTAGCTAGGCGATATTACACACCTAGGCGAA–3′

11. *Entre bolhas*. Qual é a distância entre bolhas de transcrição nos genes de *E. coli* que estão sendo transcritos em velocidade máxima?

12. *Uma bolha reveladora*. Considere a bolha de transcrição RNA-DNA sintética ilustrada aqui. Refiramo-nos à fita de DNA de codificação, à fita-molde e à fita de RNA como fitas 1, 2 e 3, respectivamente.



(a) Suponha que a fita 3 seja marcada com ^{32}P em sua extremidade 5′, e que se efetue uma eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes. Preveja o padrão autorradiográfico para (i) apenas a fita 3, (ii) as fitas 1 e 3, (iii) as fitas 2 e 3, (iv) as fitas 1, 2 e 3, e (v) as fitas 1, 2 e 3 e o cerne da RNA polimerase.

(b) Qual é o provável efeito da rifampicina sobre a síntese de RNA nesse sistema?

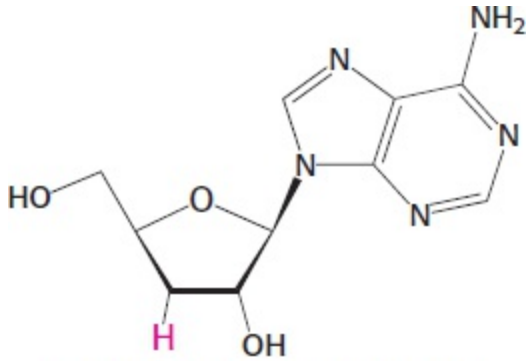
(c) A heparina bloqueia o alongamento do iniciador (*primer*) de RNA quando acrescentada ao cerne da RNA polimerase antes do início da transcrição, mas não se for adicionada após a iniciação da transcrição. Explique essa diferença.

(d) Suponha que a síntese seja efetuada na presença de ATP, CTP e UTP. Compare o comprimento do maior produto obtido com aquele esperado quando estão presentes todos os quatro ribonucleosídios trifosfatos.

13. *Marcas de revisão*. Os principais produtos da revisão pela RNA polimerase consistem em dinucleotídios, e não em mononucleotídios. Por quê?

14. *Ciclo abortivo*. Em certas ocasiões, di e trinucleotídios são liberados da RNA polimerase no início da transcrição, um processo denominado ciclo abortivo. Esse processo requer o reinício da transcrição. Sugira uma explicação plausível para o ciclo abortivo.

15. *Inibição da polimerase*. A cordicepina inibe a síntese de poli(A) em baixas concentrações e a síntese de RNA em concentrações mais altas.



Cordicepina (3'-desoxiadenosina)

(a) Qual é a base da inibição pela cordicepina?

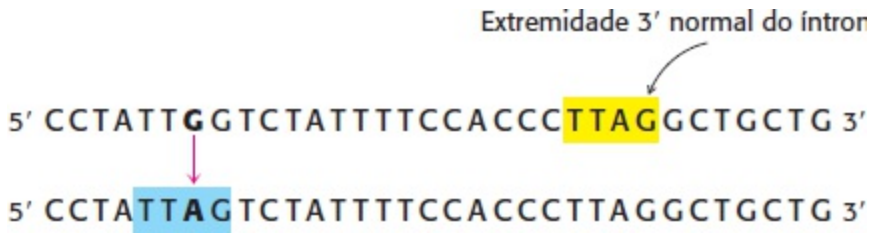
(b) Por que a síntese de poli(A) é mais sensível à presença de cordicepina?

(c) A cordicepina precisa ser modificada para exercer o seu efeito?

16. *Splicing alternativo*. Um gene contém oito sítios onde é possível a ocorrência de *splicing* alternativo. Partindo da pressuposição de que o padrão de *splicing* em cada sítio é independente daquele dos outros sítios, quantos produtos de *splicing* são possíveis?

17. *Superespiralamento*. O superespiralamento negativo do DNA favorece a transcrição de genes, visto que facilita o desenrolamento. Entretanto, nem todos os promotores são estimulados pelo superespiralamento negativo. O sítio promotor para a própria topoisomerase II é uma notável exceção. O superespiralamento negativo diminui a taxa de transcrição desse gene. Proponha um mecanismo possível para esse efeito e sugira uma razão pela qual pode ocorrer.

18. *Um fragmento extra*. Em um tipo de mutação que leva a uma das formas de talassemia, a mutação de uma única base (G para A) gera um novo sítio de *splicing* 3′ (azul na ilustração a seguir) semelhante ao normal (amarelo), porém mais a montante.



Qual é a sequência de aminoácidos do segmento extra da proteína sintetizada em um paciente com talassemia que tenha uma mutação resultando em *splicing* aberrante? A fase de leitura após o sítio de *splicing* começa com TCT.

19. *Um mensageiro de cauda longa*. Outro paciente com talassemia tinha uma mutação levando à produção de um mRNA para a cadeia β da hemoglobina com 900 nucleotídios a mais do que o normal. A cauda poli(A) desse mRNA mutante estava localizada poucos nucleotídios depois da única sequência AAUAAA na sequência adicional. Proponha uma mutação que levaria à produção desse mRNA alterado.

Questão sobre mecanismo

20. *Edição do RNA*. Muitas moléculas de uridina são inseridas em alguns mRNA mitocondriais em tripanossomos. Os resíduos de uridina provém da cauda poli(U) de uma fita doadora. Os nucleosídios trifosfatos não participam dessa reação. Proponha um mecanismo de reação que explique esses achados. (Dica: Relacione a edição do RNA com o seu *splicing*.)

Questões Integração de capítulos

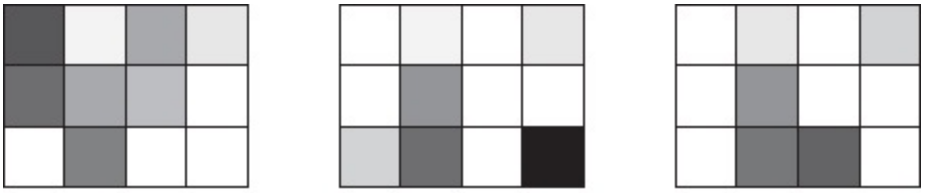
21. *Complexidade do proteoma*. Que processos considerados neste capítulo tornam o proteoma mais complexo do que o genoma? Que processos poderiam acentuar ainda mais essa complexidade?

22. *Técnica de separação*. Sugira um meio pelo qual você poderia separar o mRNA de outros tipos

de RNA em uma célula eucariótica.

Questões Interpretação de dados

23. *Experimento de escoamento*. Foram isolados núcleos do cérebro, do fígado e do músculo. Em seguida, esses núcleos foram incubados com α-[^{32}P]UTP em condições que possibilitam a síntese de RNA, exceto pela presença de um inibidor da iniciação do RNA. O RNA radioativo foi isolado e hibridizado com várias sequências de DNA que tinham sido ligadas a um *chip* gênico. Nos gráficos anexos, a intensidade do sombreado indica aproximadamente quantos mRNA foram ligados a cada sequência de DNA.



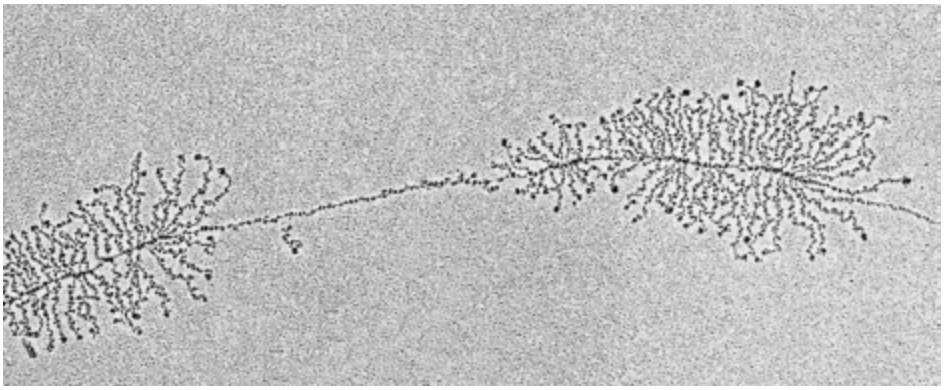
(a) Por que a intensidade de hibridização difere entre os genes?

(b) Por que algumas moléculas de RNA apresentam diferentes padrões de hibridização em tecidos diferentes?

(c) Alguns genes são expressos em todos os três tecidos. O que você poderia sugerir sobre a natureza desses genes?

(d) Sugira um motivo pelo qual um inibidor de iniciação foi incluído na mistura da reação.

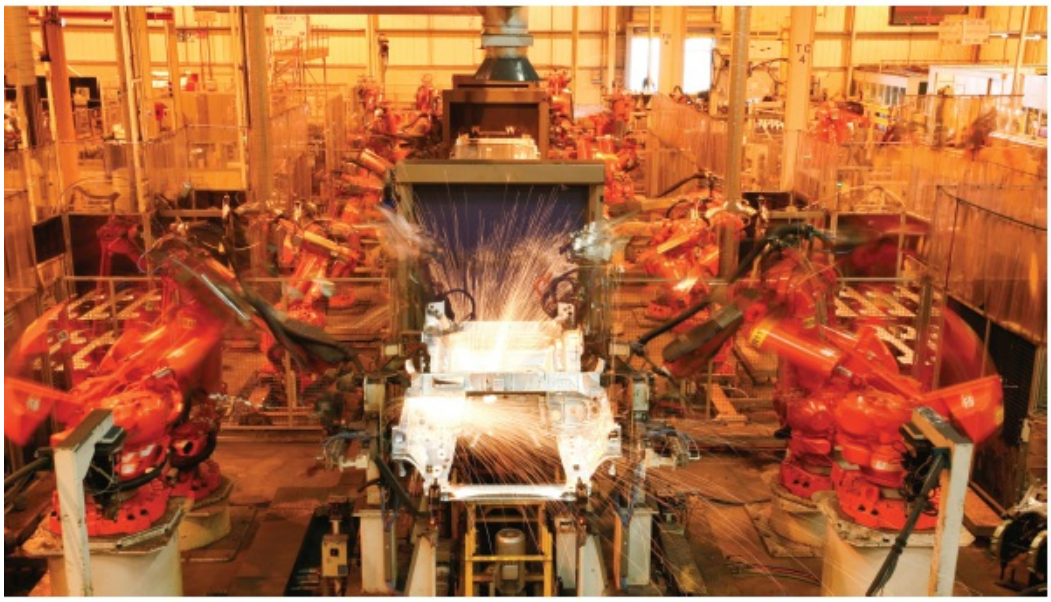
24. *Árvores de natal*. A autorradiografia a seguir mostra vários genes bacterianos sofrendo transcrição. Identifique o DNA. Quais são as fitas de comprimento crescente? Onde está o início da transcrição? E o final da transcrição? Neste trecho, qual é o sentido da síntese de RNA? O que você pode concluir acerca do número de enzimas que participam na síntese de RNA em determinado gene?

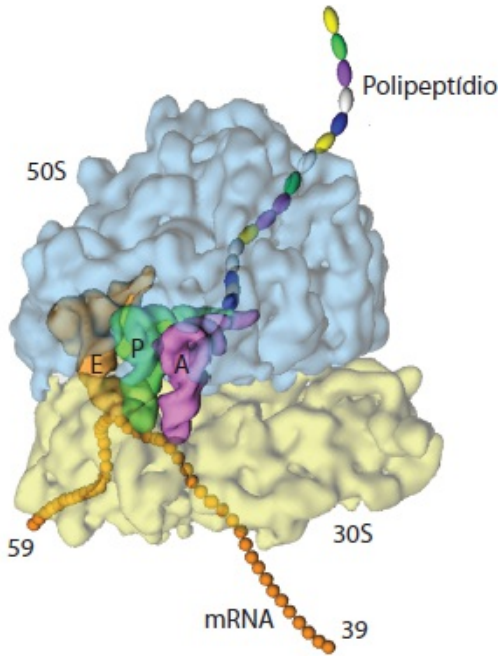


O Capítulo 29 inclui material da 6ª edição de Susan J. Baserga e Erica A. Champion.

Síntese de Proteínas

30





O ribossomo, mostrado à direita, é uma fábrica de produção de polipeptídios. Os aminoácidos são transportados até o ribossomo, um de cada vez, conectados a moléculas de RNA transportador. Cada aminoácido é unido à cadeia polipeptídica em crescimento, que só se desprende do ribossomo após o polipeptídio estar completo. Essa abordagem de linha de montagem possibilita a rápida montagem de cadeias polipeptídicas muito longas, com impressionante acurácia. [Imagem à esquerda, de Birmingham Premium/Alamy.]

SUMÁRIO

30.1 A síntese de proteínas requer a tradução de sequências de nucleotídios em sequências de aminoácidos

30.2 As aminoacil-RNA transportador sintetases fazem a leitura do código genético

30.3 O ribossomo constitui o local de síntese de proteínas

30.4 A síntese de proteínas pelos eucariotos difere da síntese procariótica basicamente no início da tradução

30.5 Vários antibióticos e toxinas podem inibir a síntese de proteínas

30.6 Os ribossomos ligados ao retículo endoplasmático fabricam proteínas secretoras e de membrana

A informação genética é de suma importância pelas proteínas que codifica, já que estas desempenham a maioria dos papeis funcionais nas células. Nos Capítulos 28 e 29, examinamos como o DNA é replicado e transcrito em RNA. Passaremos agora ao mecanismo de síntese de proteínas, um processo denominado *tradução*, visto que o alfabeto de quatro letras dos ácidos nucleicos é traduzido no alfabeto totalmente diferente, de vinte letras, das proteínas. A tradução é um processo conceitualmente mais complexo do que a replicação ou a transcrição, ambos os quais ocorrem dentro da estrutura de uma linguagem comum de pareamento de bases. Condizente com a sua

posição, estabelecendo um vínculo entre as linguagens dos ácidos nucleicos e das proteínas, o processo de síntese de proteínas depende, criticamente, tanto de fatores relacionados com os ácidos nucleicos quanto de fatores proteicos. A síntese de proteínas ocorre nos *ribossomos* – enormes complexos que contêm três grandes moléculas de RNA e mais de 50 proteínas. Entre os maiores triunfos da bioquímica nos últimos anos, está a determinação da estrutura do ribossomo e seus componentes, de modo que a sua função já pode ser examinada com detalhes anatômicos. Talvez a conclusão mais significativa desses estudos seja a de que *o ribossomo é uma ribozima*, isto é, o componente de RNA desempenha os papeis mais fundamentais. Essas observações sustentam fortemente a noção de que a vida evoluiu a partir de um mundo de RNA e que o ribossomo é um sobrevivente desse mundo.

As moléculas de RNA transportador (tRNA) e o RNA mensageiro (mRNA) também são participantes fundamentais no processo de síntese de proteínas. A ligação entre os aminoácidos e os ácidos nucleicos é inicialmente feita por enzimas denominadas aminoacil-tRNA sintetases. Ao ligar especificamente um determinado aminoácido a cada tRNA, essas enzimas traduzem o código genético.

Embora o RNA seja de suma importância no processo de tradução, são também necessários fatores proteicos para a síntese eficiente de uma proteína. Os fatores proteicos participam na iniciação, no alongamento e no término da síntese de proteínas. NTPases com alça P da família de proteínas G desempenham papeis particularmente importantes. Convém lembrar que essas proteínas atuam como interruptores moleculares, à medida que passam da forma ligada ao GTP para uma forma ligada ao GDP (Seção 14.1). Neste capítulo nos concentraremos principalmente na síntese de proteínas nos procariotos, já que ilustra muitos princípios gerais e está bem elucidada. Apresentaremos também algumas características diferenciais da síntese de proteínas nos eucariotos.

30.1 A síntese de proteínas requer a tradução de sequências de nucleotídios em sequências de aminoácidos

As bases da síntese de proteínas são as mesmas em todos os reinos da vida, o que mostra que o sistema de síntese de proteínas surgiu muito cedo na evolução. Um mRNA é descodificado ou lido na direção 5′ para 3′, um códon de cada vez, e a proteína correspondente é sintetizada na direção aminoterminal para carboxiterminal pela adição sequencial de aminoácidos à extremidade carboxila da cadeia peptídica em crescimento (Figura 30.1). Os aminoácidos chegam à cadeia em crescimento na forma ativada, como aminoacil-tRNA, criados pela união do grupo carboxila de um aminoácido com a extremidade 3′ de uma molécula de tRNA. A ligação de um aminoácido a seu tRNA correspondente é catalisada por uma *aminoacil-tRNA sintetase*. A clivagem do ATP aciona essa reação de ativação. Para cada aminoácido, existe habitualmente uma enzima ativadora e pelo menos um tipo de tRNA.

A síntese de proteínas longas requer baixa frequência de erros

O processo de transcrição é análogo ao da cópia, parágrafo por parágrafo, da página de um livro. Não há nenhuma mudança de alfabeto ou vocabulário, de modo que a probabilidade de uma alteração de significado é pequena. A tradução da sequência de bases de uma molécula de mRNA em uma

sequência de aminoácidos é análoga à tradução da página de um livro em outro idioma. A tradução é um processo complexo, que envolve muitas etapas e dúzias de moléculas. Existe um potencial de erro em cada etapa. A complexidade da tradução cria um conflito entre dois requisitos: o processo precisa ser acurado e rápido o suficiente, indo de encontro às necessidades de uma célula. Em *E. coli*, a tradução pode ocorrer em uma taxa de 50 aminoácidos por segundo, uma velocidade verdadeiramente impressionante se considerarmos a complexidade do processo.

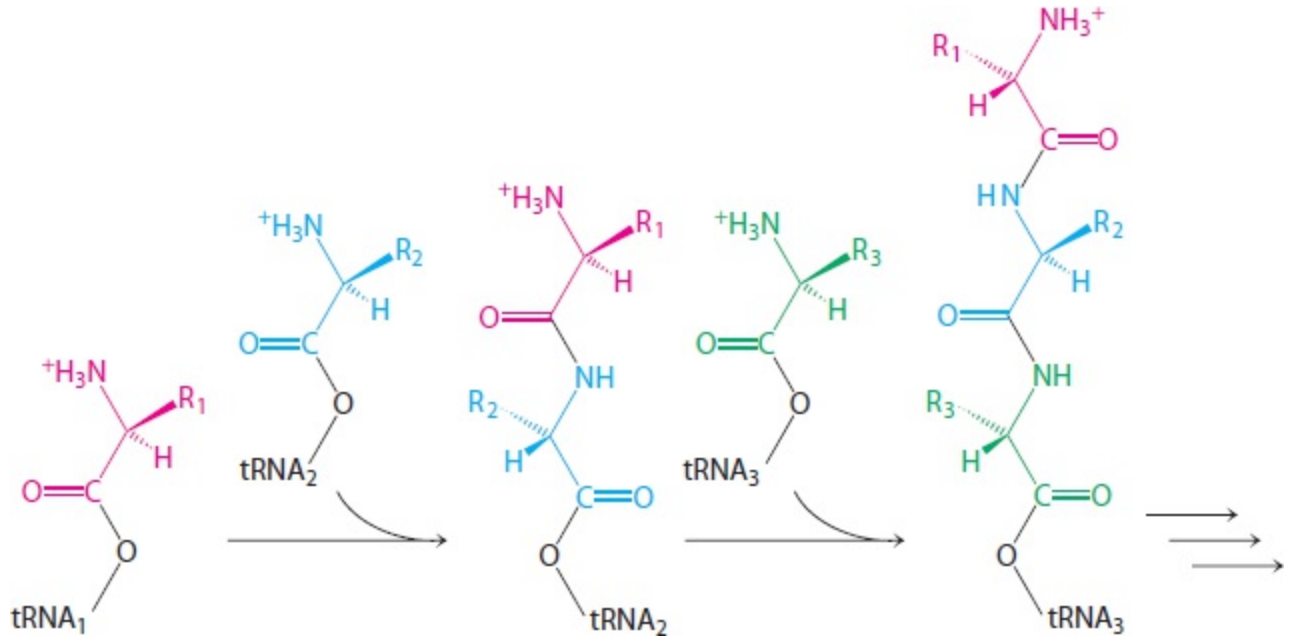


Figura 30.1 Crescimento da cadeia polipeptídica. As proteínas são sintetizadas pela adição sucessiva de aminoácidos à extremidade carboxiterminal.

Até que ponto a síntese de proteínas precisa ser acurada? Consideremos as taxas de erros. A probabilidade de formar uma proteína sem qualquer erro depende do número de resíduos de aminoácidos e da frequência (ε) de inserção de um aminoácido incorreto. Como mostra a Tabela 30.1, uma frequência de erro de 10^{-2} é intolerável, mesmo para proteínas muito pequenas. Um valor de de 10^{-3} leva habitualmente a uma síntese sem erros de uma proteína de 300 resíduos (cerca de 33 kDa), mas não de uma proteína de 1.000 resíduos (cerca de 110 kDa). Por conseguinte, a frequência de erro não deve aproximar muito de 10^{-4} para produzir efetivamente as maiores proteínas. As frequências de erros mais baixas são concebíveis; entretanto, com a exceção das proteínas maiores, elas não irão aumentar acentuadamente a porcentagem de proteínas com sequencias acuradas. Além disso, essas taxas de erros mais baixas provavelmente só são possíveis mediante uma redução na taxa de síntese de proteínas, devido à necessidade de um tempo adicional para a revisão. *De fato, os valores observados de aproximam-se de 10^{-4}. Uma frequência de erro de cerca de 10^{-4} por resíduo de aminoácido foi escolhida no decorrer da evolução para a produção acurada de proteínas constituídas de até 1.000 aminoácidos, enquanto mantém uma velocidade notavelmente rápida para a síntese de proteínas*.

Tabela 30.1 Acurácia da síntese de proteínas.

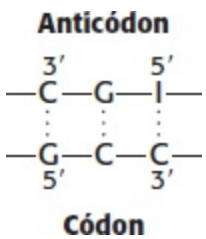
Frequência de inserção de um	Probabilidade de síntese de proteínas sem erro: Número de resíduos de aminoácidos

aminoácido incorreto	100	300	1.000
10^{-2}	0,366	0,049	0,000
10^{-3}	0,905	0,741	0,368
10^{-4}	0,990	0,970	0,905
10^{-5}	0,999	0,997	0,990

Nota: a probabilidade p de formar uma proteína sem erros depende de n, o número de aminoácidos, e de ε, a frequência de inserção de um aminoácido incorreto; $p = (1 - \varepsilon)^n$.

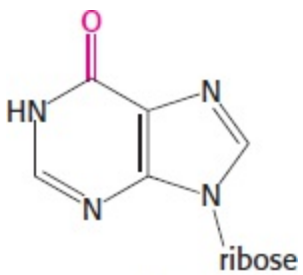
As moléculas de RNA transportador apresentam um padrão comum

A fidelidade da síntese de proteínas exige o reconhecimento acurado de códons de três bases no RNA mensageiro. Convém lembrar que o código genético correlaciona cada aminoácido a um códon de três letras (Seção 4.6). Um aminoácido não pode por si só reconhecer um códon; consequentemente, o aminoácido é ligado a uma molécula específica de tRNA que á capaz de reconhecer o códon pelo pareamento de bases de Watson-Crick. *O RNA transportador atua como molécula adaptadora, que se liga a um códon específico e carrega com ele um aminoácido para a sua incorporação na cadeia polipeptídica*.



Códon

Consideremos o alanil-tRNA de levedura, assim designado pelo fato de transportar o aminoácido alanina. O alanil-tRNA de levedura foi o primeiro ácido nucleico a ser sequenciado. Essa molécula adaptadora consiste em uma cadeia simples de 76 ribonucleotídios (Figura 30.2). A extremidade 5′-terminal é fosforilada (pG), enquanto a extremidade 3′-terminal tem um grupo hidroxila livre. O *sítio de ligação ao aminoácido* é o grupo 3′-hidroxila do resíduo de adenosina na extremidade 3′ da molécula. A sequência 5′-ICG-3′ no meio da molécula é o *anticódon*, onde I é a base purínica, inosina. Ela é complementar a 5′-GCC-3′, um dos códons para a alanina.



Inosina

Hoje em dia, são conhecidas milhares de sequências de tRNA. O achado notável é que todas elas podem ser dispostas em um padrão de trevo, em que cerca da metade dos resíduos apresenta

pareamento de bases (Figura 30.3). Por conseguinte, *as moléculas de tRNA apresentam muitas características estruturais comuns*. Esse achado não é inesperado, visto que todas as moléculas de tRNA devem ser capazes de interagir quase da mesma maneira com os ribossomos, os mRNA e os fatores proteicos que participam na tradução.

Todas as moléculas conhecidas de RNA transportador têm as seguintes características:

1. Cada uma delas consiste em uma única cadeia contendo entre *73 e 93 ribonucleotídios* (cerca de 25 kDa).

2. Elas contêm *muitas bases incomuns*, tipicamente entre 7 e 15 por molécula. Algumas dessas bases são derivados metilados ou dimetilados de A, U, C e G, formados pela modificação enzimática de um tRNA precursor. Algumas metilações impedem a prevenção de alguns pares de bases, tornando, assim, essas bases acessíveis para interagirem com outras bases. Além disso, a metilação confere um caráter hidrofóbico a algumas regiões dos tRNA, o que pode ser importante para a sua interação com sintetases e proteínas ribossômicas. Outras modificações alteram o reconhecimento de códons, como descreveremos brevemente.

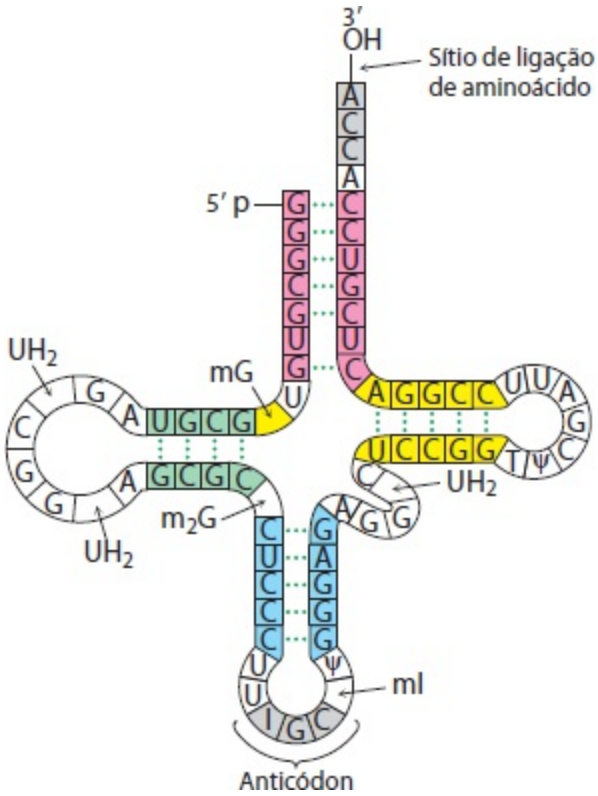


Figura 30.2 Sequência do alanil-tRNA. São mostradas a sequência de bases do alanil-tRNA de levedura e a estrutura secundária deduzida em forma de trevo. Os nucleosídios modificados são abreviados da seguinte maneira: metilinosina (ml), di-hidrouridina (UH_2), ribotimidina (T), pseudouridina (ψ), metilguanosina (mG) e dimetilguanosina (m_2G). A inosina (I), outro nucleosídio modificado, faz parte do anticódon.

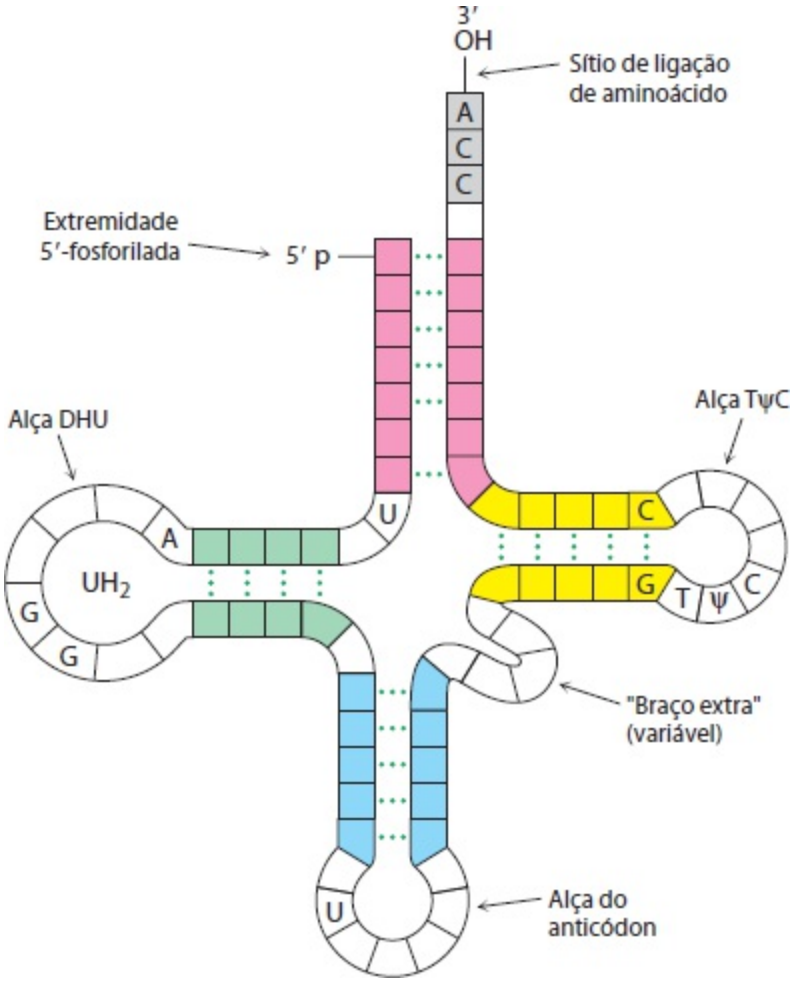
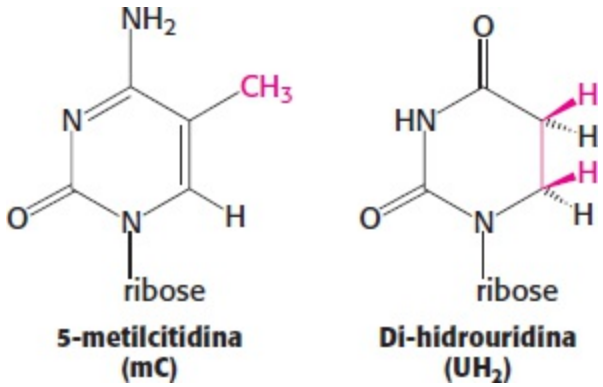


Figura 30.3 Estrutura geral das moléculas de tRNA. A comparação das sequências de bases de muitos tRNA revela várias características conservadas.



3. A molécula tem uma forma em L (Figura 30.4).

4. Cerca da metade dos nucleotídios nos tRNA forma pares de bases, produzindo duplas-hélices. As quatro regiões helicoidais são dispostas para formar dois segmentos aparentemente contínuos de dupla-hélice. Esses segmentos assemelham-se ao DNA em forma de A, conforme esperado de uma hélice de RNA (p. 120). Uma das hélices, contendo as extremidades 5′ e 3′, segue horizontalmente no modelo ilustrado na Figura 30.5. A outra hélice, que contém o anticódon e segue verticalmente na Figura 30.5, forma o outro braço do L.

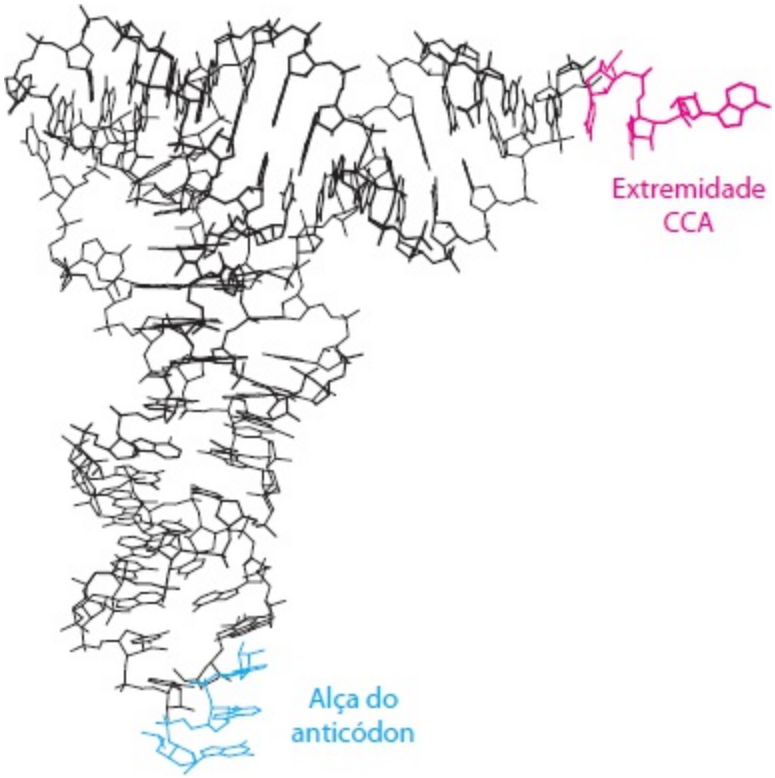


Figura 30.4 Estrutura do RNA transportador. *Observe* a estrutura em forma de L revelada por esse modelo esquelético do fenilalanil-tRNA de levedura. A região CCA encontra-se na extremidade de um braço, enquanto a alça do anticódon está na outra extremidade. [Desenhada a partir de 1EHZ.pdb.]

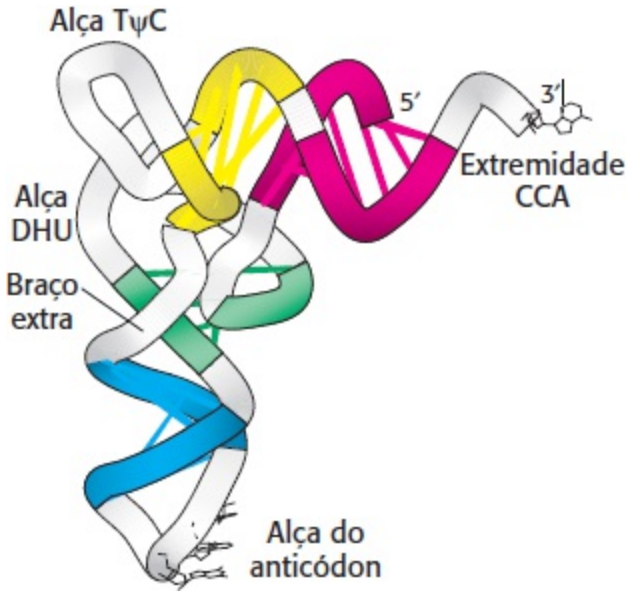


Figura 30.5 Disposição da hélice no tRNA. As quatro regiões de fita dupla do tRNA (ver Figura 30.3) empilham-se, formando uma estrutura em L. [Desenhada a partir de 1EHZ.pdb.]

Cinco grupos de bases não formam pares desse modo: a *região terminal 3'CCA*, que faz parte de uma região denominada *haste aceptora*; a *alça TψC*, que recebeu esse nome em virtude da sequência ribotimina-pseudouracila-citosina; o *"braço extra"*, que contém um número variável de resíduos; a *alça DHU*, que contém vários resíduos di-hidrouracila; e a *alça do anticódon*. A maioria das bases nas regiões não helicoidais participa de interações com pontes de hidrogênio, mesmo se as interações não forem semelhantes àquelas dos pares de bases de Watson-Crick. A diversidade estrutural produzida por essa combinação de hélices e alças contendo bases modificadas assegura que os tRNA possam ser especificamente distinguidos, apesar de estruturalmente semelhantes de

modo global.

5. A extremidade 5′ de um tRNA é fosforilada. O resíduo 5′-terminal é habitualmente pG.

6. Um aminoácido ativado é ligado a um grupo hidroxila do resíduo de adenosina no sítio de ligação de aminoácido, localizado na extremidade do componente 3′CCA da haste aceptora (Figura 30.6). Essa região de fita simples pode mudar de conformação durante a ativação do aminoácido e a síntese de proteína.

7. A alça do anticódon, que está presente em uma alça próxima ao centro da sequência, encontra-se na outra extremidade do L, tornando acessíveis as três bases que compõem o anticódon.

Assim, a arquitetura da molécula de tRNA é bem adequada para o seu papel como adaptador: o anticódon está disponível para interagir com um códon apropriado no mRNA, enquanto a extremidade que está ligada a um aminoácido ativado está bem posicionada para participar na formação da ligação peptídica.

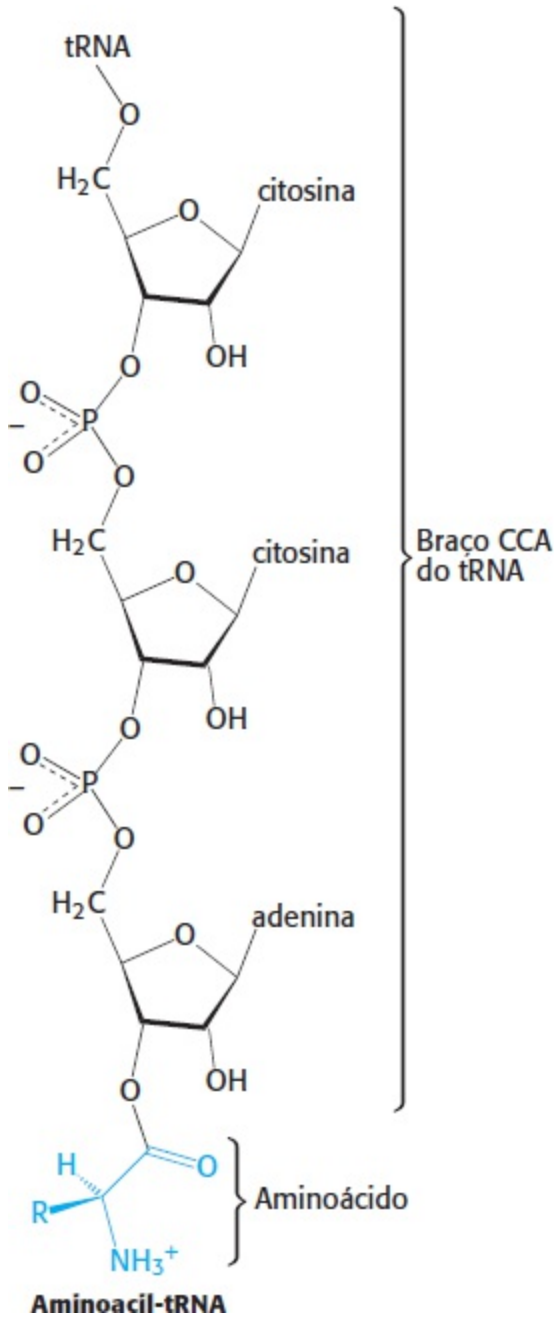
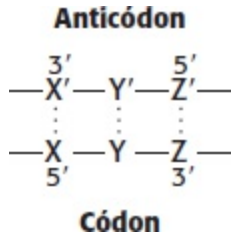


Figura 30.6 Aminoacil-tRNA. Os aminoácidos são acoplados aos tRNA por ligações éster ao grupo 2′ ou 3′-hidroxila do

resíduo de 3′-adenosina. A figura mostra uma ligação ao grupo 3′-hidroxila.

Algumas moléculas de RNA transportador reconhecem mais de um códon, devido à oscilação no pareamento de bases

Quais são as regras que governam o reconhecimento de um códon pelo anticódon de um tRNA? Uma hipótese simples sustenta que cada uma das bases do códon forma um par de bases do tipo Watson-Crick com uma base complementar no anticódon do tRNA. O códon e o anticódon estariam, então, alinhados de modo antiparalelo. No diagrama da margem, o apóstrofo indica a base complementar. Assim, X e X′ seriam A e U (ou U e A) ou G e C (ou C e G). De acordo com esse modelo, um determinado anticódon pode reconhecer apenas um códon.

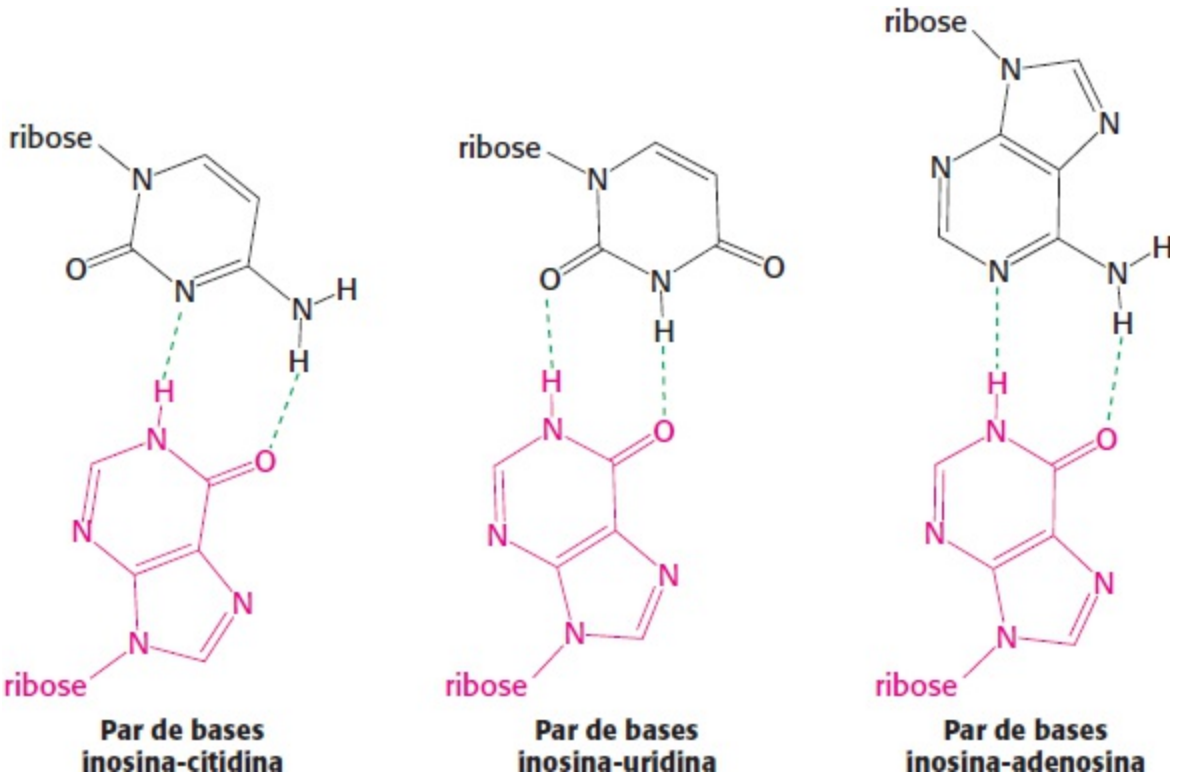


Os fatos são diferentes. Conforme observado experimentalmente, *algumas moléculas de tRNA podem reconhecer mais de um códon*. Por exemplo, o alanil-tRNA de levedura liga-se a *três* códons: GCU, GCC e GCA. As primeiras duas bases desses códons são as mesmas, enquanto a terceira é diferente. É possível que o reconhecimento da terceira base de um códon seja, algumas vezes, menos discriminativo do que o reconhecimento das outras duas? O padrão de degeneração do código genético indica que este poderia ser o caso. XYU e XYC codificam o mesmo aminoácido; XYC e XYG geralmente o fazem. Francis Crick deduziu desses dados que os critérios estéricos poderiam ser menos rigorosos para o pareamento da terceira base do que para as outras duas. Modelos de vários pares de bases foram construídos para determinar quais deles são semelhantes aos pares de base padrões A · U e G · C com relação à distância e ao ângulo entre as ligações glicosídicas. A inosina foi incluída nesse estudo, porque apareceu em vários anticódons. Partindo da pressuposição da existência de alguma liberdade estérica (“oscilação”) no pareamento da terceira base do códon, as combinações mostradas na Tabela 30.2 parecem ser plausíveis.

Tabela 30.2 Pareamentos permitidos na terceira base do códon, de acordo com a hipótese da oscilação.

Primeira base do anticódon	Terceira base do códon
C	G
A	U
U	A ou G
G	U ou C
I	U, C ou A

A *hipótese da oscilação* está, hoje em dia, firmemente estabelecida. Os anticódons dos tRNA de sequência conhecida ligam-se aos códons previstos por esta hipótese. Por exemplo, o anticódon do alanil-tRNA de levedura é IGC. Esse tRNA reconhece os códons GCU, GCC e GCA. Convém lembrar que, por convenção, as sequências de nucleotídios são escritas no sentido 5′ 3′, a menos que indicado de outro modo. Por conseguinte, I (a base 5′ desse anticódon) emparelha com U, C ou A (a base 3′ do códon), conforme previsto.



Duas generalizações podem ser feitas no que concerne à interação códon-anticódon:

1. O pareamento das duas primeiras bases de um códon ocorre de acordo com o modo padrão. O reconhecimento é preciso. Assim, *os códons que diferem em uma de suas duas primeiras bases devem ser reconhecidos por tRNA diferentes*. Por exemplo, tanto UUA quanto CUA codificam a leucina, porém são lidos por tRNA diferentes.

2. A primeira base de um anticódon determina se uma determinada molécula de tRNA faz a leitura de 1,2 ou 3 tipos de códons: C ou A (um códon), U ou G (dois códons) ou I (três códons). Assim, *parte da degeneração do código genético surge da imprecisão (oscilação) no pareamento da terceira base do códon com a primeira base do anticódon*. Vemos aqui um forte motivo para o aparecimento frequente da inosina, um dos nucleosídios incomuns, nos anticódons. *A inosina maximiza o número de códons que pode ser lido por determinada molécula de tRNA.* As bases de inosina no tRNA são formadas pela desaminação da adenosina após a síntese do transcrito primário.

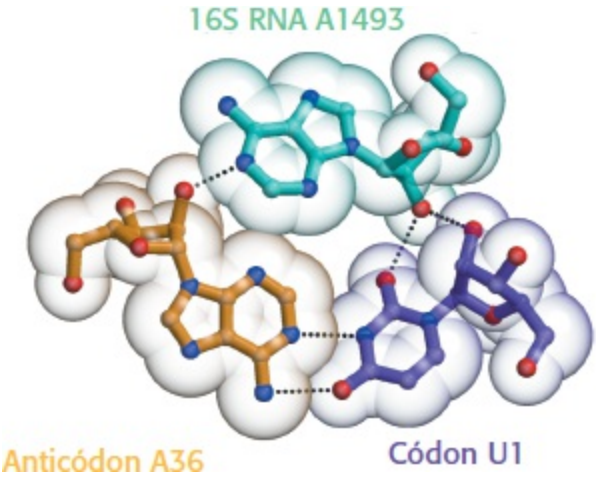


Figura 30.7 O rRNA 16S monitora o pareamento de bases entre o códon e o anticódon. A adenina 1493, uma das três bases universalmente conservadas no rRNA 16S, só forma pontes de hidrogênio com as bases no códon e no anticódon se tanto o códon quanto o anticódon estiverem corretamente pareados. [De J. M. Ogle and V. Ramakrishnan. *Annu. Rev. Biochem*. 74:129-177, 2005, Fig. 2a.]

Por que a oscilação é tolerada na terceira posição do códon, mas não nas duas primeiras? Podemos responder a essa questão se considerarmos a interação do tRNA com o ribossomo. Como veremos, os ribossomos são enormes complexos de RNA-proteína que consistem em duas subunidades: as subunidades 30S e 50S. A subunidade 30S tem uma molécula de RNA, o rRNA 16S, que tem três bases universalmente conservadas – a adenina 1492, a adenina 1493 e a guanina 530 –, que formam pontes de hidrogênio no lado do sulco menor, porém apenas com pares de bases corretamente formados do dúplex códon-anticódon (Figura 30.7). Essas interações servem para verificar se existem pares de bases de Watson-Crick nas duas primeiras posições do dúplex códon-anticódon. Esse método de inspeção não é observado na terceira posição; por conseguinte, são tolerados pares de bases mais variados. Esse mecanismo com propósito de assegurar a fidelidade é análogo às interações no sulco menor utilizadas pela DNA polimerase para um propósito semelhante (Seção 28.1). *Por conseguinte, o ribossomo desempenha um papel ativo na decodificação das interações códon-anticódon.*

30.2 As aminoacil-RNA transportador sintetases fazem a leitura do código genético

Antes do encontro do códon e anticódon, os aminoácidos necessários para a síntese de proteínas precisam ligar-se inicialmente a moléculas específicas de tRNA. A ligação de um aminoácido a um tRNA é crucial por dois motivos. *Em primeiro, a ligação de determinado aminoácido a um tRNA específico estabelece o código genético*. Quando um aminoácido tiver sido ligado a um tRNA, ele será incorporado a uma cadeia polipeptídica em crescimento, em uma posição estabelecida pelo anticódon do tRNA. *O segundo motivo, como a formação de uma ligação peptídica entre os aminoácidos livres não é termodinamicamente favorável, o aminoácido precisa ser inicialmente ativado para que a síntese de proteínas prossiga. Os intermediários ativados na síntese de proteínas são ésteres de aminoácidos*, nos quais o grupo carboxila de um aminoácido está ligado ao grupo 2′- ou 3′-hidroxila da unidade de ribose na extremidade 3′ do tRNA. Um éster de aminoácido do tRNA é denominado *aminoacil-tRNA* ou, algumas vezes, *tRNA carregado* (ver Figura 30.6). Para

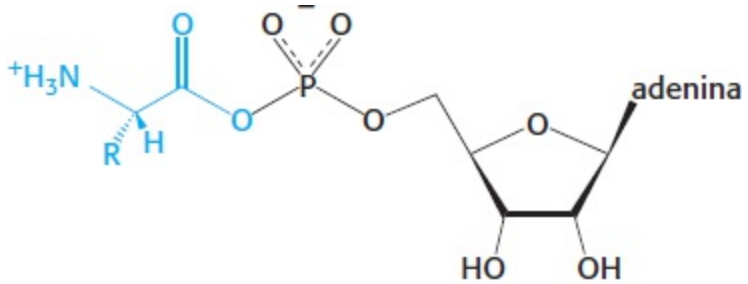
um aminoácido específico ligado a seu tRNA correspondente – por exemplo, treonina –, o tRNA carregado é designado como Thr-tRNA^{Thr}.

Os aminoácidos são inicialmente ativados por adenilação

A reação de ativação é catalisada por *aminoacil-tRNA sintetases* específicas, que também são denominadas *enzimas ativadoras*. A primeira etapa consiste na formação de um *aminoacil adenilato* a partir de um aminoácido e ATP.

$$\text{Aminoácido} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{aminoacil-AMP} + PP_i$$

Essa espécie ativada é um anidrido misto, em que o grupo carboxila do aminoácido está ligado ao grupo fosforila do AMP; por esse motivo, também é conhecido como *aminoacil-AMP*.



Aminoacil-adenilato

A próxima etapa consiste na transferência do grupo aminoacil do aminoacil-AMP para determinada molécula de tRNA, formando *aminoacil-tRNA*.

$$\text{Aminoacil-AMP} + \text{tRNA} \rightleftharpoons \text{aminoacil-tRNA} + \text{AMP}$$

A soma dessas etapas de ativação e transferência é

$$\text{Aminoácido} + \text{ATP} + \text{tRNA} \rightleftharpoons \text{aminoacil-tRNA} + \text{AMP} + PP_i$$

A $\Delta G^{\circ\prime}$ dessa reação é próxima de 0, visto que a energia livre da hidrólise da ligação éster do aminoacil-tRNA assemelha-se àquela da hidrólise do ATP a AMP e PP_i. Como já tivemos a oportunidade de ver muitas vezes, a reação é acionada pela hidrólise do pirofosfato. A soma dessas três reações é altamente exergônica:

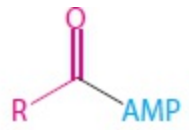
$$\text{Aminoácido} + \text{ATP} + \text{tRNA} + H_2O \rightarrow \text{aminoacil-tRNA} + \text{AMP} + 2P_i$$

Por conseguinte, *o equivalente de duas moléculas de ATP é consumido na síntese de cada aminoacil-tRNA*. Uma delas é consumida na formação da ligação éster do aminoacil-tRNA, enquanto a outra é consumida para impulsionar a reação.

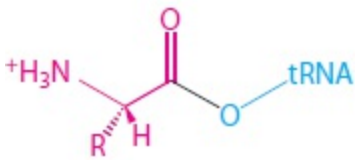
As etapas de ativação e de transferência de determinado aminoácido são catalisadas pela mesma aminoacil-tRNA sintetase. Na verdade, *o intermediário aminoacil-AMP não se dissocia da sintetase;* ele está firmemente ligado ao sítio ativo da enzima por interações não covalentes. O aminoacil-AMP normalmente é um intermediário transitório na síntese de aminoacil-tRNA, porém é relativamente estável e prontamente isolado se o tRNA estiver ausente na mistura da reação.

Já encontramos um intermediário acil adenilato na ativação dos ácidos graxos (Seção 22.2). A principal diferença entre essas reações é que o aceptor do grupo acila é a CoA na ativação dos

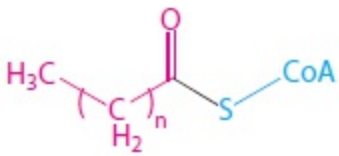
ácidos graxos e o tRNA na ativação dos aminoácidos. A energética dessas biossínteses é muito semelhante: ambas tornam-se irreversíveis em virtude da hidrólise do pirofosfato.



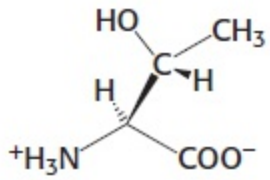
Intermediário
acil adenilato



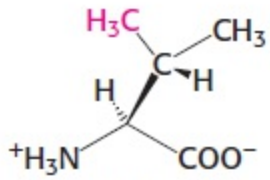
Aminoacil-tRNA



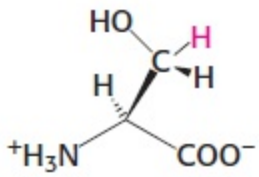
Acil-CoA de ácido graxo



Treonina



Valina



Serina

As aminoacil-tRNA sintetases apresentam sítios de ativação de aminoácidos altamente discriminantes

Cada aminoacil-tRNA sintetase é altamente específica para determinado aminoácido. Com efeito, uma sintetase irá incorporar um aminoácido incorreto somente uma vez em 10^4 ou 10^5 reações catalíticas. Como esse nível de especificidade é alcançado? Cada aminoacil-tRNA sintetase tira proveito das propriedades de seu aminoácido substrato. Consideremos o desafio enfrentado pela

treonil-tRNA sintetase. A treonina é particularmente semelhante a dois outros aminoácidos: a valina e a serina. A valina tem quase exatamente a mesma forma que a treonina, exceto que a valina apresenta um grupo metila em lugar de um grupo hidroxila. A serina tem um grupo hidroxila, como a treonina, porém carece do grupo metila. Como a treonil-tRNA sintase pode evitar o acoplamento desses aminoácidos incorretos ao treonil-tRNA?

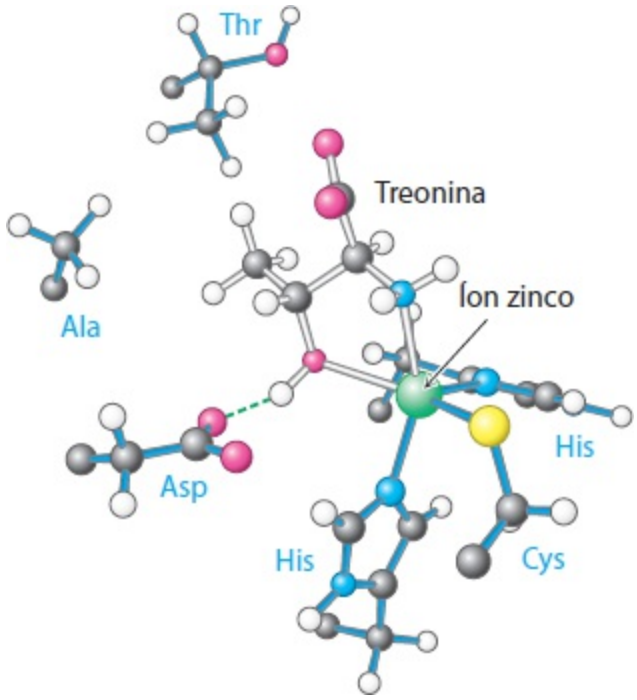


Figura 30.8 Sítio ativo da treonil-tRNA sintetase. *Observe* que o sítio de ligação de aminoácido inclui um íon zinco (bola verde) que coordena a treonina através de seus grupos amino e hidroxila.

A estrutura do sítio de ligação de aminoácidos da treonil-tRNA sintetase revela como a valina é evitada (Figura 30.8). A sintetase contém um íon zinco, ligado à enzima por dois resíduos de histidina e um resíduo de cisteína. Os sítios de coordenação remanescentes estão disponíveis para a ligação de substrato. A treonina coordena-se com o íon zinco através de seu grupo amina e do grupo hidroxila da cadeia lateral. O grupo hidroxila da cadeia lateral é ainda reconhecido por um resíduo de aspartato ligado a ele por ponte de hidrogênio. O grupo metila presente na valina em lugar dessa hidroxila não pode participar dessas interações; ela é excluída desse sítio ativo e, portanto, não é adenilada nem transferida para o treonil-tRNA (abreviado como $tRNA^{Thr}$). O uso de um íon zinco parece ser exclusivo da treonil-tRNA sintetase; outras aminoacil-tRNA sintetases apresentam estratégias diferentes para o reconhecimento de seus aminoácidos correspondentes. O grupo carboxilato da treonina corretamente posicionada está disponível para atacar o grupo α fosforila do ATP, formando aminoacil adenilato.

O sítio do zinco tem menos capacidade de discriminação contra a serina, visto que esse aminoácido apresenta um grupo hidroxila que pode se ligar ao íon zinco. De fato, a treonil-tRNA sintetase, dispondo apenas desse mecanismo, acopla incorretamente a serina ao treonil-tRNA, em uma taxa de 10^{-2} a 10^{-3} vezes a da treonina. Conforme assinalado na página 894, essa taxa de erro provavelmente leva a muitos erros de tradução. Como é obtido um nível mais alto de especificidade?

A revisão por aminoacil-tRNA sintetases aumenta a fidelidade da síntese de proteínas

A treonil-tRNA sintetase pode ser incubada com $tRNA^{Thr}$ ligado covalentemente à serina (Ser-$tRNA^{Thr}$); o tRNA foi "carregado incorretamente". A reação é imediata: a hidrólise rápida do aminoacil-tRNA forma serina e tRNA livre. Por outro lado, a incubação com Thr-$tRNA^{Thr}$ corretamente carregado não resulta em nenhuma reação. Assim, a treonil-tRNA sintetase contém um sítio funcional adicional que hidrolisa Ser-$tRNA^{Thr}$, mas não Thr-$tRNA^{Thr}$. Esse sítio de edição cria uma oportunidade para que a sintetase possa corrigir seus erros e melhorar a sua fidelidade para menos de um erro em 10^4. Os resultados de estudos estruturais e de mutagênese revelaram que o sítio de edição está mais de 20 Å distante do sítio de ativação (Figura 30.9). Esse sítio de edição aceita prontamente o Ser-$tRNA^{Thr}$ e o cliva, porém não cliva o Thr-$tRNA^{Thr}$. Essa discriminação entre serina e treonina é fácil, visto que a treonina contém um grupo metila *extra*; um sítio que se adapta à estrutura da serina excluirá estericamente a treonina.

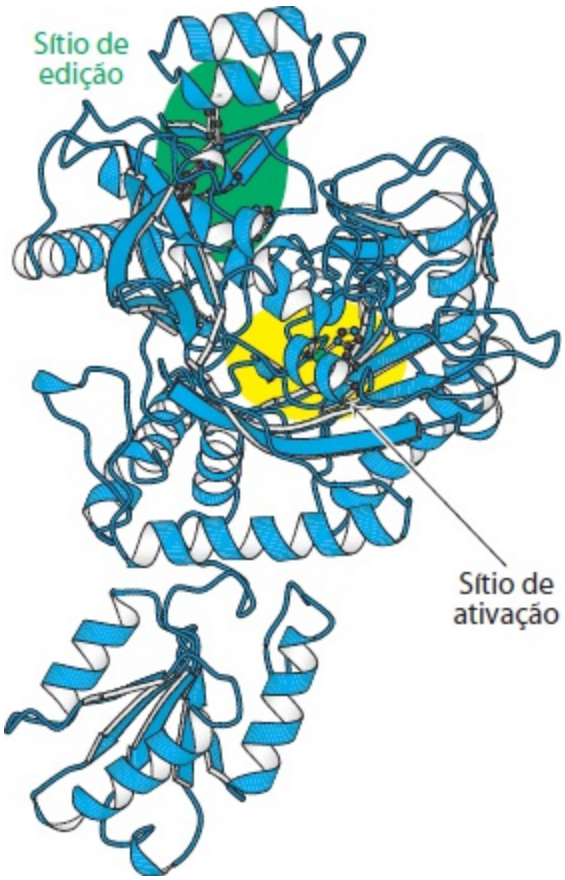


Figura 30.9 Sítio de edição. Estudos de mutagênese revelaram a posição do sítio de edição (mostrado em verde) na treonil-tRNA sintetase. Essa ilustração, bem como as subsequentes, mostra apenas uma subunidade da enzima dimérica. [Desenhada a partir de 1QF6.pdb.]

A maioria das aminoacil-tRNA sintetases contém sítios de edição, além dos sítios de ativação. Esses pares complementares de sítios atuam como *duplo crivo* para assegurar uma alta fidelidade. Em geral, o sítio de acilação rejeita aminoácidos que são *maiores* do que o correto, visto que não há espaço suficiente para eles, enquanto o sítio hidrolítico cliva espécies ativadas que são menores do que a espécie correta.

A estrutura do complexo entre a treonil-tRNA sintetase e seu substrato revela que o CCA aminoacilado pode sair do sítio de ativação e oscilar para o sítio de edição (Figura 30.10). Assim, o aminoacil-tRNA pode ser editado sem ser dissociado a sintetase. Essa revisão, que depende da flexibilidade de conformação de um curto segmento de sequência de polinucleotídio, é totalmente

análoga à da DNA polimerase (Seção 28.1). Em ambos os casos, a edição sem dissociação melhora significativamente a fidelidade com um custo apenas modesto de tempo e energia.

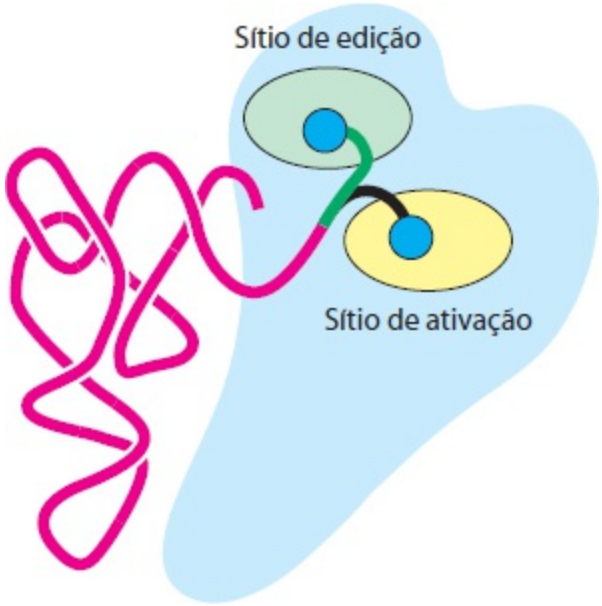


Figura 30.10 Edição do aminoacil-tRNA. O braço CCA flexível de um aminoacil-tRNA pode mover o aminoácido entre o sítio de ativação e o sítio de edição. Se o aminoácido se ajustar bem no sítio de edição, ele é removido por hidrólise.

Algumas sintetases conseguem uma alta acurácia sem edição. Por exemplo, a tirosil-tRNA sintetase não tem dificuldade em discriminar a tirosina e a fenilalanina; o grupo hidroxila no anel de tirosina possibilita a sua ligação à enzima 10^4 vezes mais fortemente do que a fenilalanina. *A revisão só foi selecionada na evolução quando a fidelidade teve que ser aumentada além daquela alcançada com uma interação inicial de ligação.*

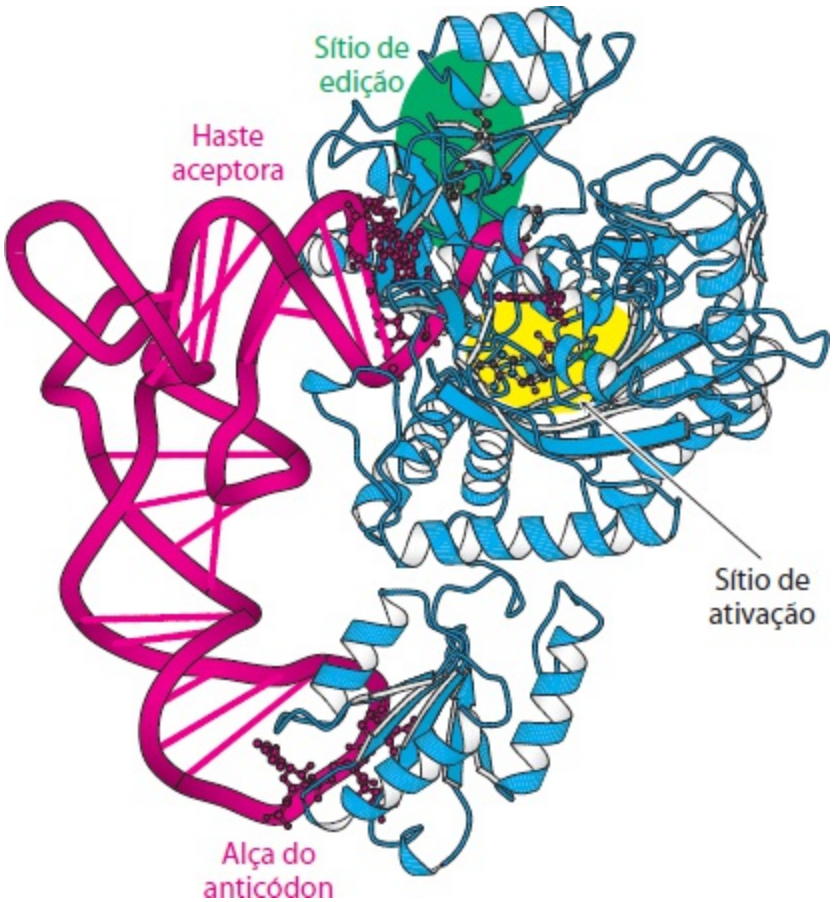


Figura 30.11 Complexo de treonil-tRNA sintetase. A estrutura mostra o complexo entre treonil-tRNA sintetase e o $tRNA^{Thr}$. *Observe* que a sintetase se liga tanto à haste aceptora quanto à alça do anticódon. [Desenhada a partir de 1QF6.pdb.]

As sintetases reconhecem várias características das moléculas de RNA transportador

Como as sintetases escolhem seus parceiros de tRNA? Essa etapa de suma importância é o ponto em que ocorre tradução – momento em que é estabelecida a correlação entre os mundos de aminoácidos e dos ácidos nucleicos. De certo modo, as aminoacil-tRNA sintetases são as únicas moléculas em biologia que "conhecem" o código genético. Seu reconhecimento preciso dos tRNA é tão importante para a síntese de proteínas com alta fidelidade quanto a seleção acurada dos aminoácidos. Em geral, o reconhecimento do tRNA pela sintetase é diferente para cada sintetase e cada pareamento com tRNA. Por isso, é difícil fazer generalizações. Examinaremos a interação da treonil-tRNA sintase com seu parceiro tRNA.

Algumas sintetases reconhecem seus parceiros de tRNA principalmente com base nos seus anticódons, embora também possam reconhecer outros aspectos da estrutura do tRNA que variam entre diferentes tRNA. A evidência mais direta provém de estudos cristalográficos de complexos formados entre as sintetases e seus tRNA correspondentes. Consideremos, por exemplo, a estrutura do complexo entre treonil-tRNA sintetase e $tRNA^{Thr}$ (Figura 30.11). Conforme esperado, o braço CCA estende-se no sítio de ativação contendo zinco, onde ele fica bem posicionado para aceitar a treonina do treonil adenilato. A enzima interage extensamente não apenas com a haste aceptora do tRNA, mas também com a alça do anticódon. As interações com a alça do anticódon são particularmente reveladoras. Cada base dentro da sequência 5′-CGU-3′ do anticódon participa em pontes de hidrogênio com a enzima; aqueles com as segundas duas bases (G e U) parecem ser mais importantes, visto que a sintetase interage tão eficientemente com os anticódons GGU e UGU. Embora as interações entre a enzima e o anticódon geralmente sejam cruciais para o reconhecimento correto, a Figura 30.12 mostra que muitos aspectos das moléculas de tRNA são reconhecidos pelas sintetases. Observe que muitos dos sítios de reconhecimento consistem em alças ricas em bases incomuns, que podem proporcionar identificadores estruturais.

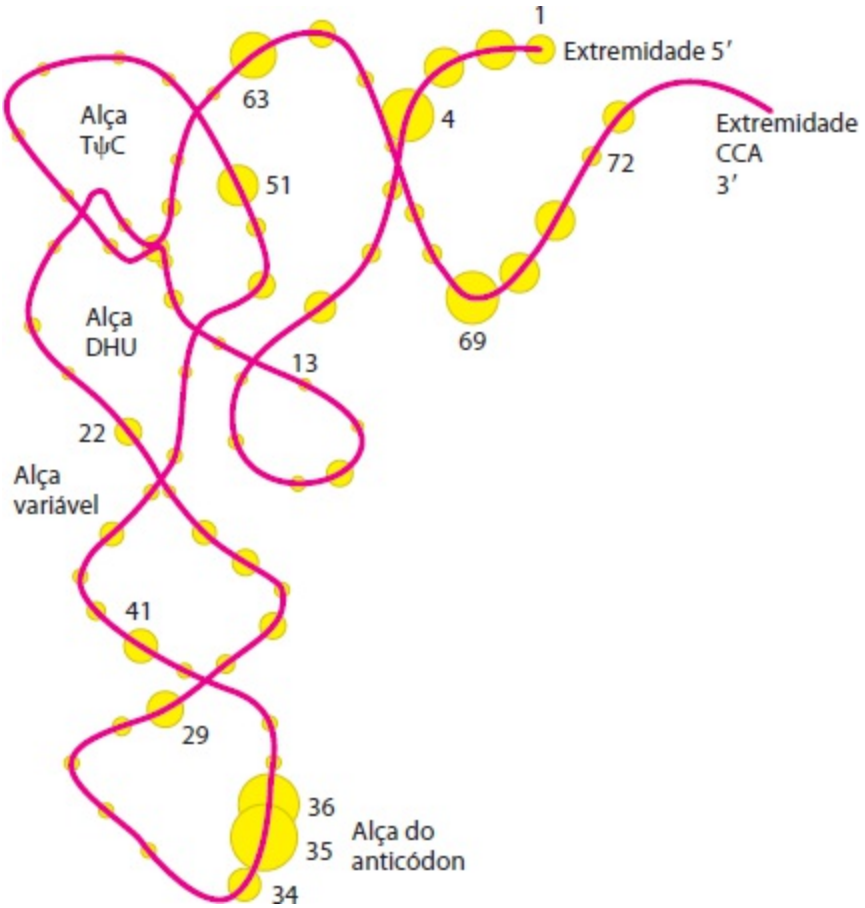


Figura 30.12 Sítios de reconhecimento do tRNA. Os círculos representam nucleotídio, e seus tamanhos são proporcionais à frequência com que são utilizados como sítios de reconhecimento pelas aminoacil-tRNA sintetases. Os números indicam as posições dos nucleotídios na sequência de bases, começando na extremidade 5′ da molécula de tRNA. [De M. Ibba and D. Söll, *Annu. Rev. Biochem*. 69:617-650, 1981, p.636.]

As aminoacil-tRNA sintetases podem ser divididas em duas classes

Existe pelo menos uma aminoacil-tRNA sintetase para cada aminoácido. Os diversos tamanhos, composição de subunidades e sequências dessas enzimas causaram perplexidade durante muitos anos. Seria possível que essencialmente todas as sintetases tivessem evoluído independentemente? A determinação das estruturas tridimensionais de várias sintetases, seguida de comparações mais aprimoradas de sequencias, revelou que as diferentes sintetase são, de fato, correlacionadas. Especificamente, as sintetases são divididas em duas classes, denominadas *classe I* e *classe II*, cada uma das quais inclui enzimas específicas para 10 dos 20 aminoácidos (Tabela 30.3). Curiosamente, as sintetases das duas classes ligam-se a faces diferentes da molécula de tRNA (Figura 30.13). O braço CCA do tRNA adota diferentes conformações para acomodar essas interações; o braço encontra-se na conformação helicoidal observada para o tRNA livre (ver Figuras 30.4 e 30.5) para enzimas da classe II e uma conformação em grampo para as enzimas da classe I. Essas duas classes também diferem de outras maneiras.

Tabela 30.3 Classificação e estrutura das subunidades de aminoacil-tRNA sintetases de E. coli.

Classe I	Classe II
Arg (α)	Ala (α4)
Cys (α)	Asn (α2)

Gln (α)	Asp (α2)
Glu (α)	Gly (α2β2)
Ile (α)	His (α2)
Leu (α)	Lys (α2)
Met (α)	Phe (α2β2)
Trp (α2)	Ser (α2)
Tyr (α2)	Pro (α2)
Val (α)	Thr (α2)

1. As enzimas da classe I acilam o grupo 2′-hidroxila da adenosina terminal do tRNA, enquanto as enzimas da classe II (exceto a enzima para Phe-tRNA) acilam o grupo 3′-hidroxila.

2. As duas classes ligam-se ao ATP em conformações diferentes.

3. A maioria das enzimas da classe I é monomérica, enquanto as enzimas da classe II são, em sua maior parte, diméricas.

Por que evoluíram duas classes distintas de aminoacil-tRNA sintetases? A observação de que as duas classes ligam-se a faces distintas do tRNA sugere uma possibilidade. Os sítios de reconhecimento em ambas as faces do tRNA podem ter sido necessários para possibilitar o reconhecimento de 20 tRNA diferentes.

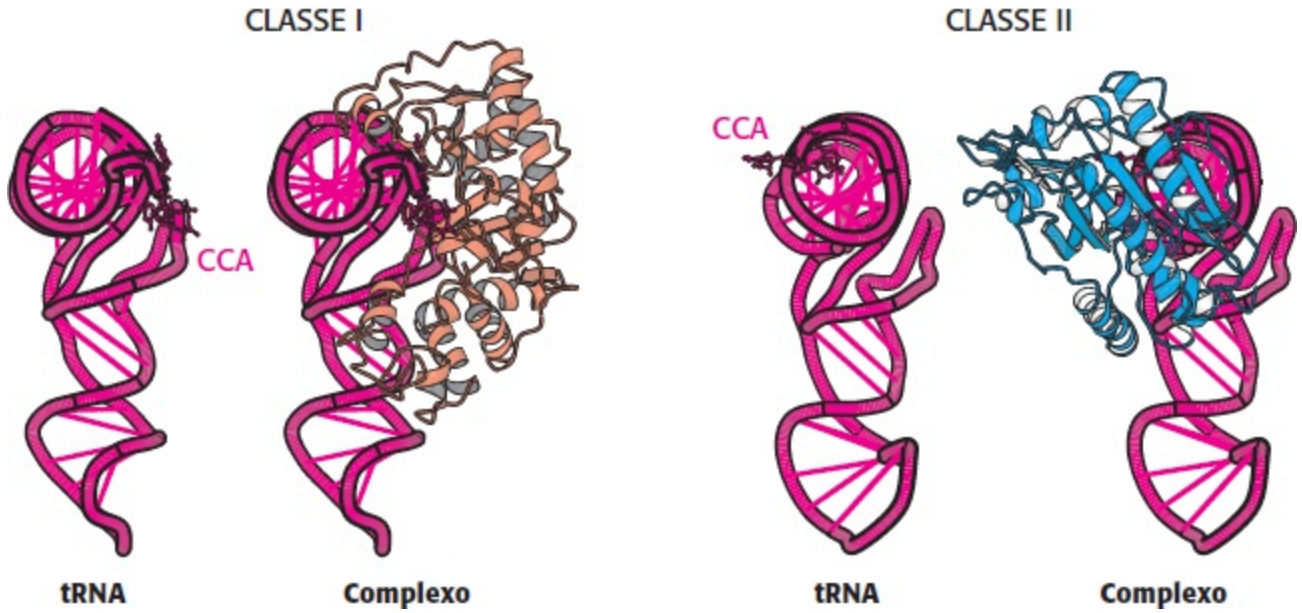


Figura 30.13 Classes de aminoacil-tRNA sintetases. *Observe* que as sintetases da classe I e da classe II reconhecem faces diferentes da molécula de tRNA. O braço CCA do tRNA adota diferentes conformações em complexos com as duas classes de sintetase. Observe que o braço CCA do tRNA está voltado para o observador (ver Figuras 30.4 e 30.5). [Desenhada a partir de 1EUY.pdb e 1QF6.pdb.]

30.3 O ribossomo constitui o local de síntese de proteínas

Passaremos agora para os ribossomos, as máquinas moleculares que coordenam a interação dos tRNA carregados, do mRNA e das proteínas que leva à síntese de proteínas. Um ribossomo de *E. coli* é uma montagem de ribonucleoproteína, com massa de cerca de 2.500 kDa, diâmetro de aproximadamente 250 Å e coeficiente de sedimentação de 70S. Os 20.000 ribossomos existentes em uma célula bacteriana constituem quase 25% de sua massa.

O ribossomo pode ser dissociado em uma *subunidade maior (50S)* e uma *subunidade menor (30S)*. Essas subunidades podem ser ainda divididas em suas proteínas constituintes e RNA. A subunidade 30S contém 21 proteínas diferentes (designadas como S1 a S21) e uma molécula de RNA 16S. A subunidade 50S contém 34 proteínas diferentes (L1 a L34) e duas moléculas de RNA, uma 23S e outra 5S. Um ribossomo contém uma cópia de cada molécula de RNA, duas cópias de cada uma das proteínas L7 e L12 e uma cópia de cada uma das outras proteínas. A proteína L7 é idêntica a L12, exceto que a sua extremidade aminoterminal é acetilada. Tanto a subunidade 30S quanto a 50S podem ser reconstituídas *in vitro* a partir de suas proteínas e RNA constituintes, como inicialmente obtido por Masayasu Nomura, em 1968. *Essa reconstituição é um notável exemplo do princípio de que complexos supramoleculares podem se formar espontaneamente a partir de seus constituintes macromoleculares*.

Foram feitos progressos incríveis sobre a estrutura do ribossomo em decorrência do uso de métodos de cristalografia de raios X, após o trabalho pioneiro de Ada Yonath. As estruturas das subunidades 30S e 50S, bem como do ribossomo 70S completo, foram determinadas em nível de resolução atômica ou próximo a ela (Figura 30.14). A determinação da estrutura do ribossomo 70S exige o posicionamento de mais de 100.000 átomos. As características dessas estruturas estão em notável concordância com as interpretações de sondas experimentais menos diretas. Essas estruturas proporcionam um valioso arcabouço para examinar o mecanismo de síntese de proteínas.

Os RNA ribossômicos (rRNA 5S, 16S e 23S) desempenham um papel central na síntese de proteínas

O prefixo *ribo* no nome *ribossomo* é apropriado, visto que o RNA constitui quase dois terços da massa dessas grandes montagens moleculares. Os três RNA presentes – 5S, 16S e 23S – são críticos para arquitetura e a função do ribossomo. São formados pela clivagem de transcritos 30S primários e outros processamentos. Essas moléculas dobram-se e formam estruturas que possibilitam a formação de pares de bases internos. Seus padrões de pareamento de bases foram deduzidos comparando as sequências de nucleotídios de muitas espécies para detectar sequências conservadas, bem como pareamentos de bases conservados. Por exemplo, o RNA 16S de uma espécie pode ter um par de bases G–C, enquanto outro pode ter um par A–U, porém a localização do par de bases é a mesma em ambas as moléculas. Experimentos de modificação química e digestão apoiaram as estruturas deduzidas de comparações de sequências (Figura 30.15). O achado notável é que todas as espécies de *RNA ribossômico (rRNA) são dobradas em estruturas definidas, que apresentam muitas regiões dúplex curtas*. Essa conclusão e praticamente todas as características da estrutura secundária foram confirmadas pelas estruturas determinadas por cristalografia de raios X.

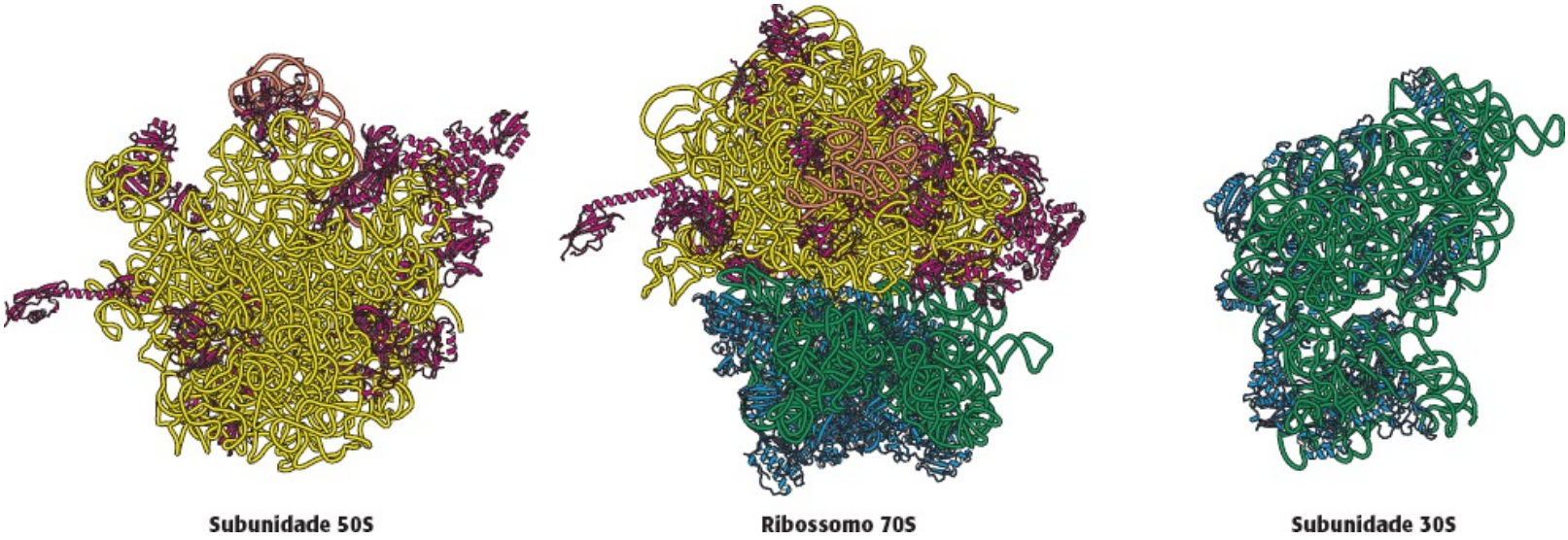


Figura 30.14 O ribossomo em alta resolução. Modelos detalhados do ribossomo, com base nos resultados de estudos de cristalografia de raios X do ribossomo 70S e das subunidades 30S e 50S: à esquerda, vista de parte da subunidade 50S que interage com a subunidade 30S; centro, vista lateral do ribossomo 70S; à direita, vista da parte da subunidade 30S que interage com a subunidade 50S. O RNA 23S é mostrado em amarelo, o RNA 5S em laranja, o RNA 16S em verde, as proteínas da subunidade 50S em vermelho, e as proteínas da subunidade 30S em azul. Observe que a interface entre as subunidades 50S e 30S consiste totalmente em RNA. [Desenhada a partir de 1GIX.pdb e 1GIY.pdb.]

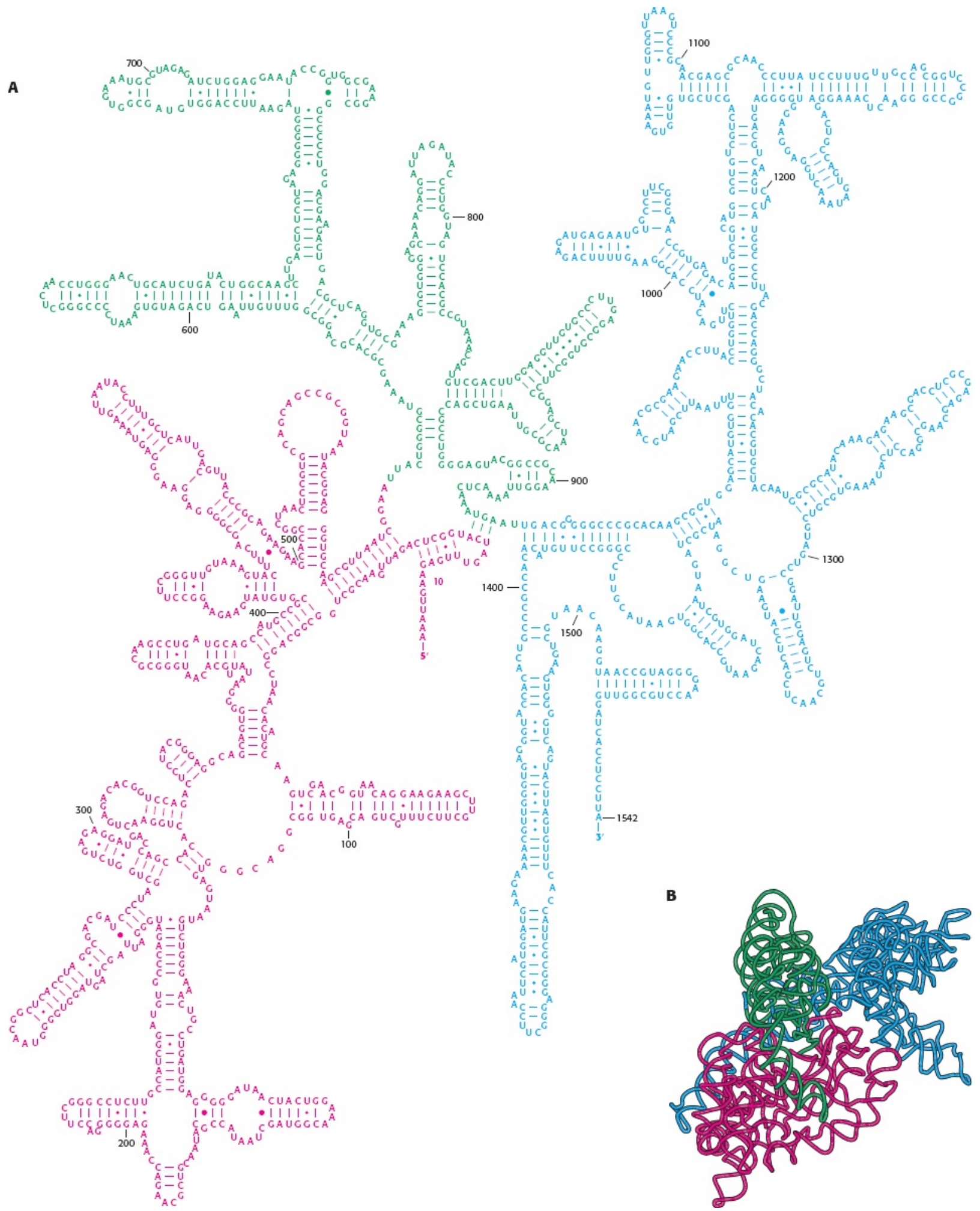


Figura 30.15 Padrão de dobramento do RNA ribossômico. A. Estrutura secundária do RNA ribossômico 16S, deduzida

da comparação de sequência e dos resultados de estudos químicos. **B**. Estrutura terciária do RNA 16S determinada por cristalografia de raios X [(**A**) Cortesia do Dr. Bryn Weiser e Dr. Harry Noller; (**B**) desenhada a partir de 1FJG.pdb.]

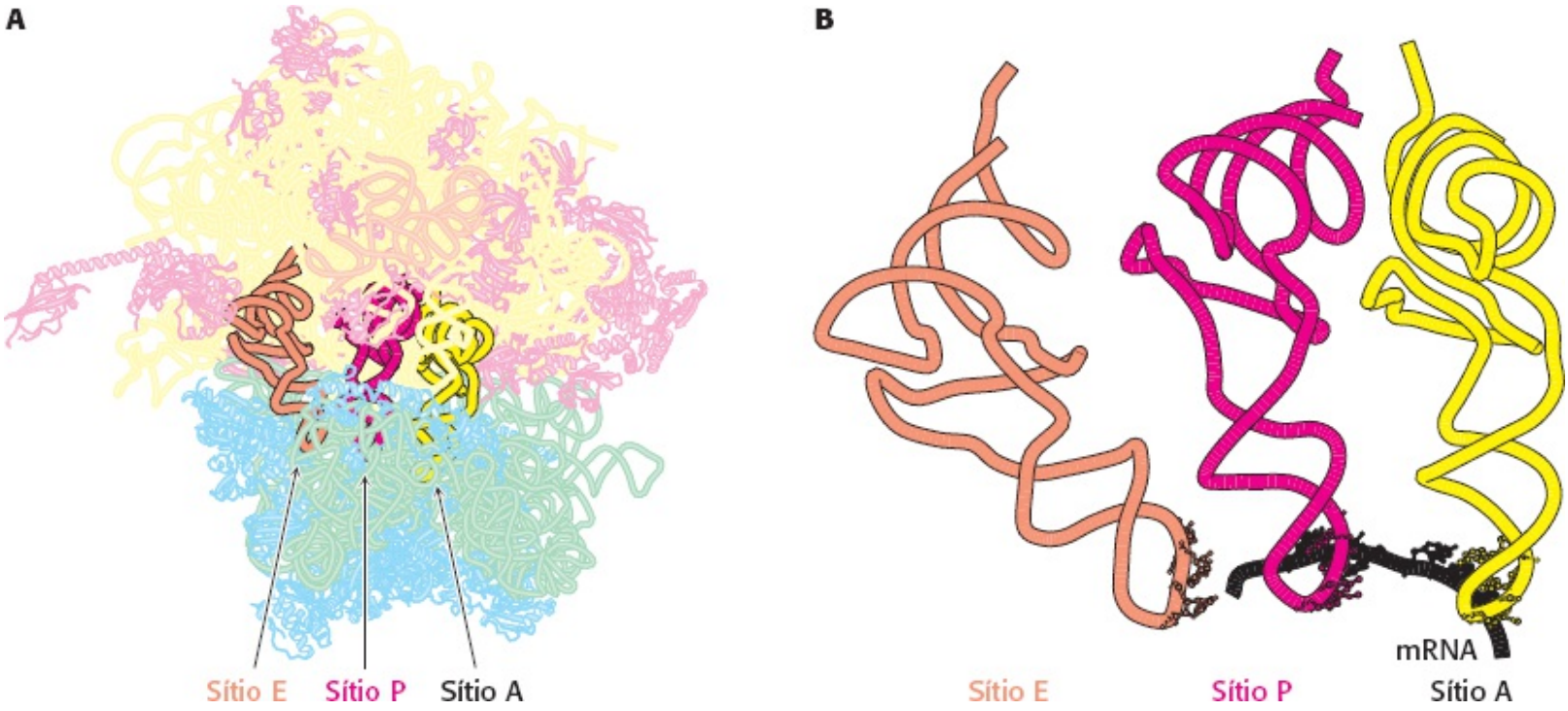


Figura 30.16 Sítios de ligação do RNA transportador. A. Três sítios de ligação de tRNA estão presentes no ribossomo 70S. São denominados sítios A (para aminoacil), P (para peptidil) e E (para *exit*, saída). Cada molécula de tRNA entra em contato com ambas as subunidades 30S e 50S. **B**. As moléculas de tRNA nos sítios A e P fazem pares de bases com o mRNA. [(B) Desenhada a partir de 1JGP. pdb.]

Durante muitos anos, acreditou-se que as proteínas ribossômicas eram as que coordenavam a síntese de proteínas, enquanto os RNA ribossômicos serviam principalmente como arcabouços estruturais. A visão atual é quase o inverso. A descoberta do RNA catalítico tornou os bioquímicos mais abertos à possibilidade de que o RNA desempenhe um papel muito mais ativo no funcionamento do ribossomo. As estruturas detalhadas tornaram claro que os principais sítios no ribossomo, como os que catalisam a formação da ligação peptídica e interagem com o mRNA e o tRNA, são compostos quase totalmente de RNA. As contribuições das proteínas são mínimas. Muitas das proteínas apresentam estruturas alongadas que "abrem seu caminho" na matriz do RNA. A conclusão quase inevitável é a de que o ribossomo era inicialmente constituído apenas de RNA e que as proteínas foram acrescentadas mais tarde para o ajuste fino de suas propriedades funcionais. Essa conclusão tem a agradável consequência de se esquivar de um dilema de causalidade: como proteínas complexas podem ser sintetizadas se elas são necessárias para a síntese de proteínas?

Os ribossomos apresentam três sítios de ligação de tRNA que unem as subunidades 30S e 50S

Três sítios de ligação de tRNA nos ribossomos estão distribuídos de modo a possibilitar a formação de ligações peptídicas entre os aminoácidos codificados pelos códons no mRNA (Figura 30.16). O fragmento de mRNA que está sendo traduzido em determinado momento está ligado dentro da subunidade 30S. Cada uma das moléculas de tRNA está em contato com ambas as *subunidades 30S e 50S*. Na extremidade 30S, duas das três moléculas de tRNA estão ligadas ao mRNA por pares de bases anticódon-códon. Esses sítios de ligação são denominados sítio A (de *a*minoacil) e sítio P (de

*p*eptidil). A terceira molécula de tRNA está ligada a um sítio adjacente, denominado sítio E (do inglês *e*xit, saída).

A outra extremidade de cada molécula de tRNA, a extremidade sem o anticódon, interage com a subunidade 50S. As hastes aceptoras das moléculas de tRNA que ocupam os sítios A e P convergem para um sítio onde ocorre formação de uma ligação peptídica. Um túnel conecta esse sítio à parte posterior do ribossomo, através do qual a cadeia peptídica passa durante a síntese (Figura 30.17).

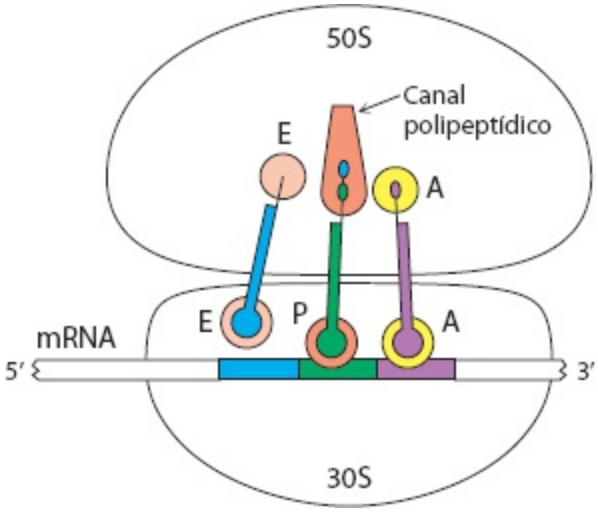


Figura 30.17 Um ribossomo ativo. Essa representação esquemática mostra as relações entre os componentes essenciais da máquina de tradução.

O sinal de início é habitualmente AUG, precedido de várias bases que emparelham com o rRNA 16S

Como começa a síntese de proteínas? A possibilidade mais simples seria que os primeiros 3 nucleotídios de cada mRNA servissem como primeiro códon. Não haveria necessidade, então, de qualquer sinal especial de início. Entretanto, os experimentos mostram que a tradução não começa imediatamente na extremidade 5′ do mRNA. Na verdade, o primeiro códon traduzido quase sempre está a mais de 25 nucleotídios distante da extremidade 5′. Além disso, nos procariotos, muitas moléculas de mRNA são *policistrônicas* ou poligênicas – isto é, codificam duas ou mais cadeias polipeptídicas. Por exemplo, uma única molécula de mRNA com cerca de 7.000 nucleotídios de comprimento especifica 5 enzimas na via de biossíntese do triptofano em *E. coli*. Cada uma dessas 5 proteínas tem seus próprios sinais de início e término no mRNA. De fato, *todas as moléculas conhecidas de mRNA contêm sinais que definem o início e o final de cada cadeia polipeptídica codificada*.

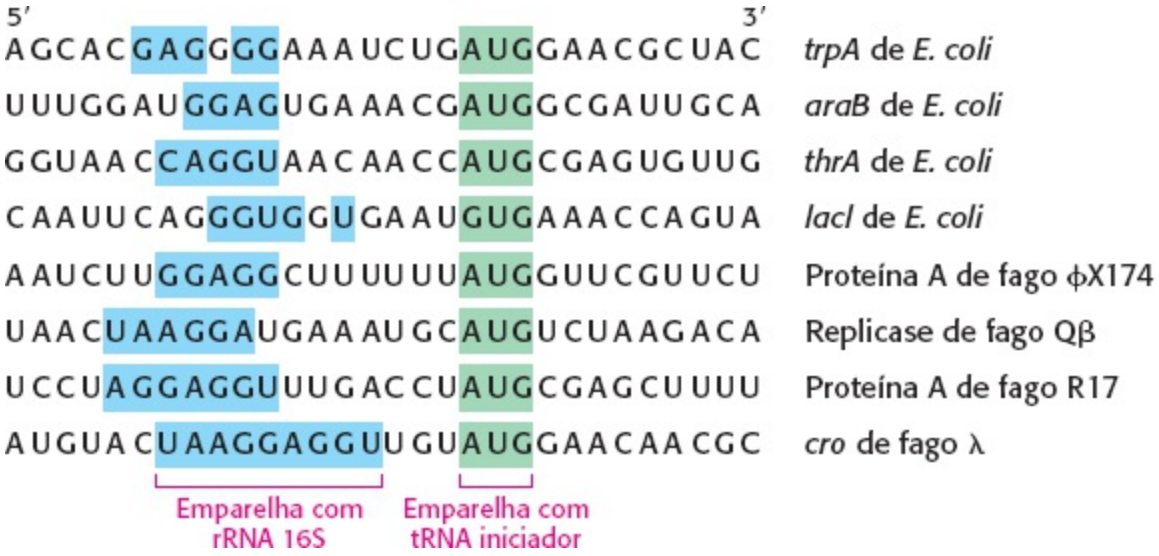


Figura 30.18 Sítios de iniciação. Sequências de sítios de iniciação do mRNA para a síntese de proteínas em algumas moléculas de mRNA de bactérias e vírus. A comparação dessas sequências revela algumas características recorrentes.

Um indício para o mecanismo de iniciação foi a descoberta de que quase metade dos resíduos aminoterminais das proteínas em *E. coli* consiste em metionina. De fato, o códon de início no mRNA é AUG (metionina) ou, com menos frequência, GUG (valina), ou, raramente, UUG (leucina). Que sinais adicionais são necessários para especificar um sítio de início da tradução? O primeiro passo para responder a essa pergunta foi o isolamento de regiões iniciadoras de diversos mRNA. Esse isolamento foi efetuado utilizando-se ribonuclease pancreática para digerir os complexos de mRNA-ribossomo (formados em condições nas quais a síntese de proteínas podia começar, mas não era possível a ocorrência de alongamento). Conforme esperado, cada região iniciadora apresenta um códon AUG (ou GUG, ou UUG) (Figura 30.18). Além disso, cada região iniciadora contém uma sequência rica em purinas centrada a cerca de 10 nucleotídios no lado 5′ do códon iniciador.

O papel dessa região rica em purinas, denominada sequência de *Shine-Dalgarno*, tornou-se evidente quando a sequência do 16S foi elucidada. A extremidade 3′ desse rRNA componente da subunidade 30S contém uma sequência de várias bases que são complementares à região rica em purinas nos sítios iniciadores do mRNA. A mutagênese da sequência CCUCC próximo à extremidade 3′ do rRNA 16S para ACACA interfere acentuadamente no reconhecimento dos sítios de iniciação no mRNA. Esse resultado e outras evidências mostram que a região iniciadora do mRNA liga-se muito perto da extremidade 3′ do rRNA 16S. O número de pares de bases que ligam o mRNA e o rRNA 16S varia de 3 a 9. Por conseguinte, *dois tipos de interações determinam onde começa a síntese de proteínas: (1) o pareamento de bases do mRNA com a extremidade 3′ do rRNA 16S e (2) o pareamento do códon iniciador no mRNA com o anticódon de uma molécula iniciadora de tRNA.*

A síntese de proteínas bacterianas é iniciada pelo formilmetionil RNA transportador

Conforme assinalado anteriormente, a metionina é o primeiro aminoácido em muitas proteínas de *E. coli*. Entretanto, o resíduo de metionina encontrado na extremidade aminoterminal das proteínas de *E. coli* é habitualmente modificado. De fato, *a síntese de proteínas nas bactérias começa com o aminoácido modificado, a N-formilmetionina* (fMet). Um tRNA especial leva a formilmetionina até o ribossomo para iniciar a síntese de proteínas. Esse *tRNA iniciador* (abreviado como $tRNA_f$) difere do tRNA que insere a metionina em posições internas (abreviado como $tRNA_m$). O subscrito "f"

indica que a metionina ligada ao tRNA iniciador pode ser formilada, mas não quando ligada ao $tRNA_m$. Embora praticamente todas as proteínas sintetizadas em *E. coli* comecem em formilmetionina em cerca da metade das proteínas, a *N*-formilmetionina é removida quando a cadeia nascente alcança um comprimento de 10 aminoácidos.

A metionina é ligada a esses dois tipos de tRNA pela mesma aminoacil-tRNA sintetase. Em seguida, uma enzima específica formila o grupo amino da molécula de metionina ligada ao $tRNA_f$ (Figura 30.19). O doador formila ativado nessa reação é o N^{10}-formiltetra-hidrofolato, um derivado do folato que transporta unidades de um carbono ativadas (Seção 24.2). A metionina livre e o metionil-$tRNA_m$ não são substratos dessa transformilase.

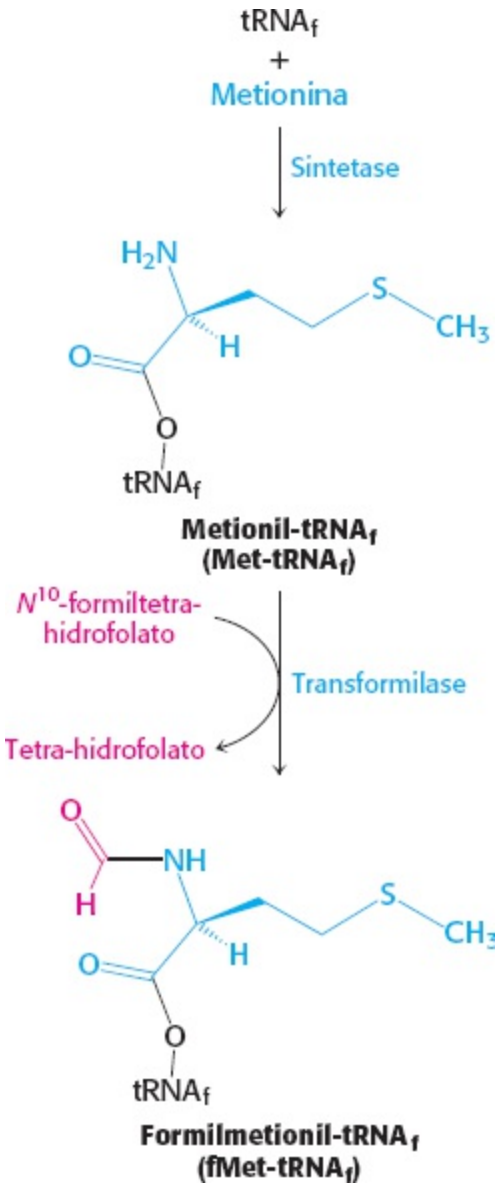


Figura 30.19 Formilação do metionil-tRNA. O tRNA iniciador ($tRNA_f$) é inicialmente carregado com metionina, e, em seguida, um grupo formila é transferido para o metionil-$tRNA_f$ a partir do N^{10}-formiltetra-hidrofolato.

O formilmetionil-tRNA é colocado no sítio P do ribossomo na formação do complexo de iniciação 70S

O RNA-mensageiro e o formilmetionil-tRNA devem ser levados até o ribossomo para iniciar a síntese de proteínas. Como isso é feito? Três *fatores de iniciação* (IF1, IF2 e IF3) proteicos são essenciais. A subunidade ribossômica 30S forma inicialmente um complexo com o IF1 e o IF3

(Figura 30.20). A ligação desses fatores à subunidade 30S impede a sua ligação prematura à subunidade 50S para formar um complexo 70S não funcional, desprovido de mRNA e de fMet-$tRNA_f$. O IF1 liga-se próximo ao sítio A e dirige o fMet-$tRNA_f$ para o sítio P. O fator de iniciação 2, um membro da família de proteínas G, liga-se ao GTP, e a mudança conformacional concomitante possibilita a associação do IF2 ao fMet-$tRNA_f$. O complexo IF2-GTP-iniciador-tRNA liga-se ao mRNA (corretamente posicionado pela interação da sequência de Shine-Dalgarno com o rRNA 16S) e à subunidade 30S para formar o *complexo de iniciação 30S*. Em seguida, alterações estruturais levam à ejeção de IF1 e IF3. O IF2 estimula a associação da subunidade 50S ao complexo. O GTP ligado ao IF2 é hidrolisado, com consequente liberação de IF2. O resultado é um *complexo de iniciação 70S*. A formação do complexo de iniciação 70S constitui a etapa limitadora de velocidade na síntese de proteínas.

Quando o complexo de iniciação 70S está formado, o ribossomo está pronto para a fase de alongamento da síntese de proteínas. A molécula fMet-$tRNA_f$ ocupa o sítio P no ribossomo, posicionada de modo que o seu anticódon emparelhe com o códon iniciador no mRNA. Os outros dois sítios para as moléculas de tRNA, o sítio A e o sítio E, estão vazios. Essa interação estabelece a fase de leitura para a tradução de todo o mRNA. Uma vez localizado o códon iniciador, grupos de três nucleotídios não superpostos são definidos.

Os fatores de alongamento levam o aminoacil-tRNA ao ribossomo

Nesse estágio, o fMet-$tRNA_f$ ocupa o sítio P, e o sítio A encontra-se vazio. A molécula particular inserida no sítio A vazio depende do códon de mRNA no sítio A. Entretanto, o aminoacil-tRNA apropriado não deixa simplesmente a sintetase e difunde-se para o sítio A. Em lugar disso, é ‘transportado até o sítio A em associação a uma proteína de 43 kDa, denominada *fator de alongamento Tu* (EF-Tu), outro membro da família de proteínas G, que necessita de GTP para a sua atividade. O EF-Tu liga-se ao aminoacil-tRNA apenas em sua forma de GTP (Figura 30.21) e o libera no ribossomo em sua forma de GDP. A ligação do EF-Tu ao aminoacil-tRNA desempenha duas funções. Na primeira, o EF-Tu protege a delicada ligação éster no aminoacil-tRNA de hidrólise. Na segunda, o GTP no EF-Tu é hidrolisado a GDP somente após a formação de um complexo apropriado entre o complexo EF-Tu-aminoacil-tRNA e o ribossomo. Se o anticódon não estiver apropriadamente pareado com o códon, não ocorre hidrólise, e o aminoacil-tRNA não é transferido para o ribossomo. Este mecanismo faz com que a energia livre da hidrólise do GTP contribua para a acurácia da síntese de proteínas.

Em seguida, o EF-Tu retorna à sua forma de GTP por um segundo fator de alongamento, o *fator de alongamento Ts*. O EF-Ts induz a dissociação do GDP. O GTP liga-se ao EF-Tu, e o EF-Ts é concomitantemente liberado. É importante assinalar que *o EF-Tu não interage com o fMet-$tRNA_f$*. Por conseguinte, esse tRNA iniciador não é levado ao sítio A. Por outro lado, o Met-$tRNA_m$, como todos os outros aminoacil-tRNA, liga-se ao EF-Tu. Esses achados explicam o fato de que *os códons AUG internos não são lidos pelo tRNA iniciador*. Por outro lado, o IF_2 reconhece o fMet-$tRNA_f$, mas não outro tRNA. O ciclo de alongamento continua até encontrar um códon de terminação.

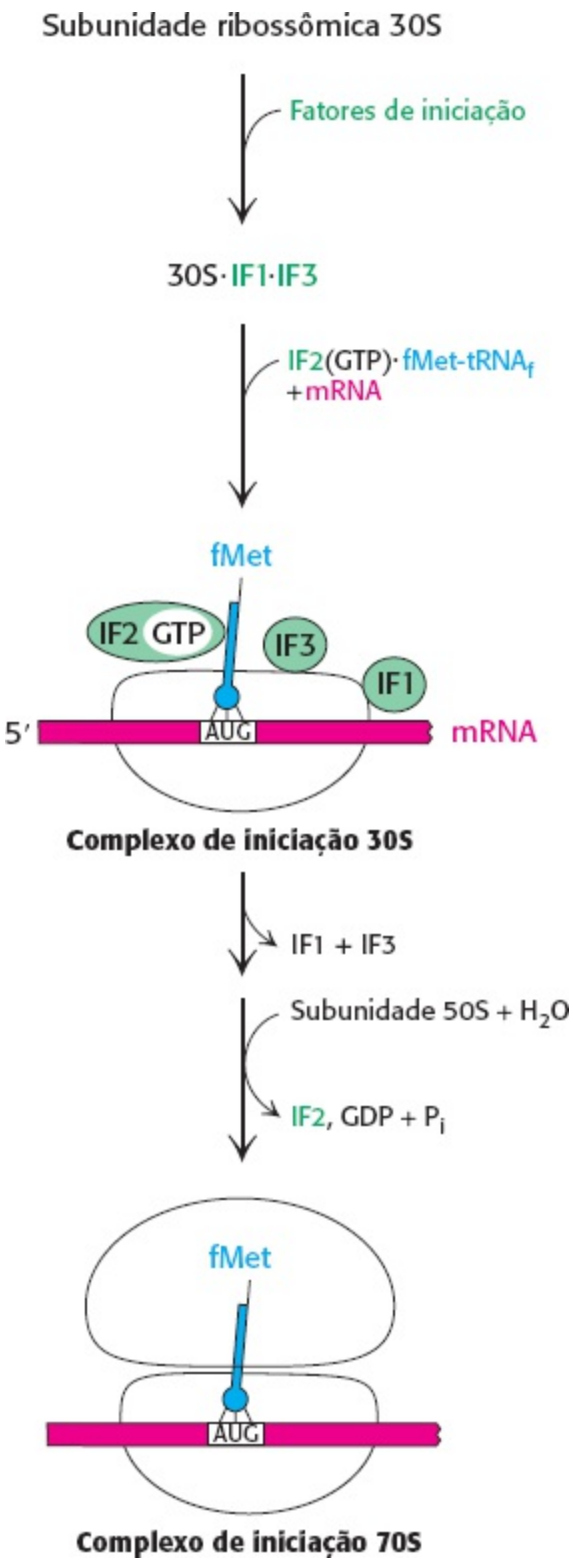


Figura 30.20 Iniciação da tradução nos procariotos. Os fatores de iniciação ajudam a montagem do complexo de iniciação 30S em primeiro lugar e, a seguir, do complexo de iniciação 70S.

Esse ciclo de GTP-GDP de EF-Tu lembra os das proteínas G heterotriméricas na transdução de sinais (Seção 14.1) e das proteínas Ras no controle do crescimento (Seção 14.3). Essa semelhança é devida à sua herança evolutiva compartilhada, observada na homologia entre o domínio aminoterminal de EF-Tu e os domínios de NTPase com alça P nas outras proteínas G. Os outros dois domínios do EF-Tu tripartido são distintos; eles medeiam interações entre o aminoacil-tRNA e o ribossomo. Em todas essas enzimas relacionadas, a mudança na conformação entre as formas com GTP e com GDP leva a uma mudança na interação com parceiros. Outra semelhança é a necessidade de uma proteína adicional para catalisar a troca de GTP por GDP; o ET-Ts catalisa a

troca para ET-Tu, assim como um receptor ativado faz para uma proteína G heterotrimérica.

A peptidil transferase catalisa a síntese de ligações peptídicas

Com ambos os sítios P e A ocupados pelo aminoacil-tRNA, estão criadas as condições para a formação de uma ligação peptídica. A molécula de formil metionina ligada ao tRNA iniciador será transferida para o grupo amino do aminoácido no sítio A. A formação da ligação peptídica, uma das ligações mais importantes na vida, é uma ligação termodinamicamente espontânea, catalisada por um sítio no rRNA 23S da subunidade 50S, denominado *centro de peptidil transferase*. Esse centro catalítico localiza-se profundamente na subunidade 50S, próximo ao túnel que possibilita a saída do peptídio nascente do ribossomo.

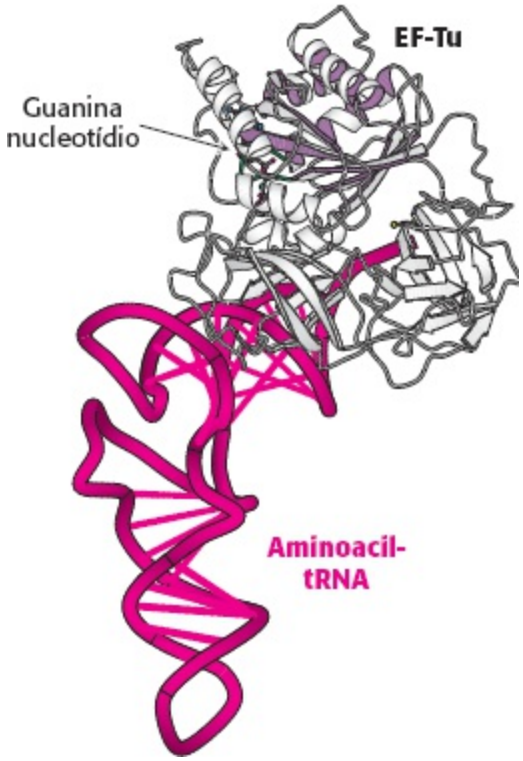


Figura 30.21 Estrutura do fator de alongamento Tu. Estrutura de um complexo entre o fator de alongamento Tu (EF-Tu) e um aminoacil-tRNA. *Observe* o domínio de NTPase com alça P (em violeta) na extremidade aminoterminal do EF-Tu. Esse domínio de NTPase assemelha-se aos de outras proteínas G. [Desenhada a partir de 1B23.pdb.]

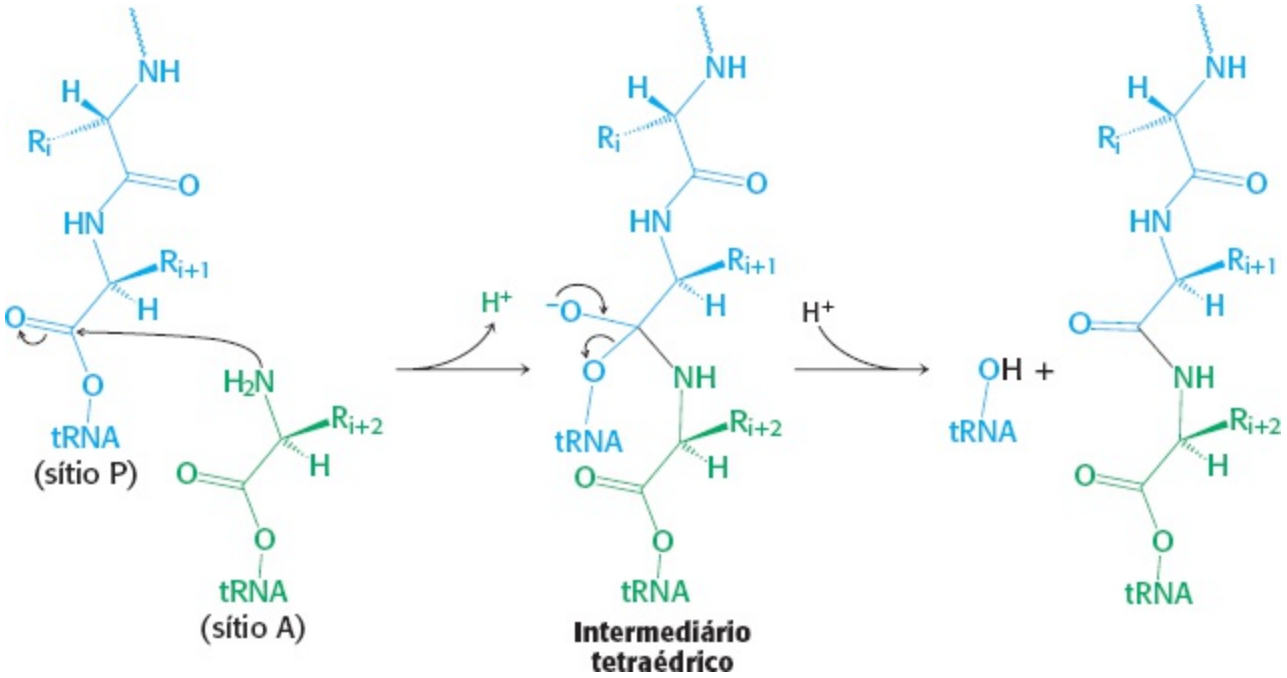


Figura 30.22 Formação da ligação peptídica. O grupo amino do aminoacil-tRNA ataca o grupo carbonila da ligação éster do peptidil-tRNA, formando um intermediário tetraédrico. Esse intermediário colapsa para formar a ligação peptídica e libera o tRNA desacilado.

O ribossomo obtém grande parte de sua potência catalítica da denominada *catálise por proximidade e orientação*. O ribossomo posiciona e orienta os dois substratos, de modo que fiquem situados para aproveitar a reatividade inerente de um grupo amina (no aminoacil-tRNA no sítio A) com um éster (no tRNA iniciador no sítio P). O grupo amino do aminoacil-tRNA no sítio A é posicionado para atacar a ligação éster entre o tRNA iniciador e a molécula de formilmetionina no sítio P (Figura 30.22). O centro da peptidil transferase inclui bases que promovem essa reação, ajudando a formar um grupo $–NH_2$ no sítio A do aminoacil-tRNA e ajudando a estabilizar o intermediário tetraédrico formado. Essa reação é, em muitos aspectos, análoga ao reverso da reação catalisada por serina proteases, como a quimiotripsina (Seção 9.1). O peptidil-tRNA é análogo à forma acil-enzima de uma serina protease. Na serina protease, a acil-enzima é produzida com o uso da energia livre associada à clivagem de uma ligação amida. No ribossomo, a energia livre necessária para formar a espécie análoga, um aminoacil-tRNA, provém do ATP que é clivado pela aminoacil-tRNA sintetase antes da chegada do tRNA no ribossomo.

A formação de uma ligação peptídica é seguida de translocação dos tRNA e do mRNA acionada pelo GTP

Com a formação da ligação peptídica, a cadeia peptídica está agora ligada ao tRNA, cujo anticódon está no sítio A na subunidade 30S. As duas subunidades rotam uma em relação à outra, e, em virtude dessa mudança estrutural, a extremidade CCA do mesmo tRNA e seu peptídio encontram-se no sítio P da subunidade maior (Figura 30.23). Entretanto, a síntese de proteínas não pode continuar sem a translocação do mRNA e dos tRNA dentro do ribossomo. O mRNA precisa se mover por uma distância de três nucleotídios, de modo que o códon seguinte seja posicionado no sítio A para interação com o aminoacil-tRNA que chega. Ao mesmo tempo, o tRNA desacilado move-se do sítio P para o sítio E na subunidade 30S, enquanto o peptidil-tRNA se move do sítio A para o sítio P na subunidade 30S. O movimento do peptidil-tRNA para o sítio P desloca o mRNA em um códon,

expondo o códon seguinte a ser traduzido no sítio A.

A estrutura tridimensional do ribossomo sofre uma mudança significativa durante a translocação, e as evidências sugerem que a translocação pode resultar de propriedades do próprio ribossomo. Entretanto, os fatores proteicos aceleram o processo. A translocação é intensificada pelo *fator de alongamento G* (EF-G, também denominado *translocase*). A Figura 30.24 mostra um possível mecanismo para acelerar o processo de translocação. Em primeiro lugar, o EF-G na forma com GTP liga-se ao ribossomo próximo ao sítio A, interagindo com o rRNA 23S da subunidade 50S. A ligação do EF-G ao ribossomo estimula a atividade de GTPase do EF-G. Com a hidrólise do GTP, o EF-G sofre uma mudança conformacional, que desloca o peptidil t-RNA no sítio A para o sítio P, carregando com ele o mRNA e o tRNA desacilado. A dissociação do mRNA deixa o ribossomo pronto para aceitar o próximo aminoacil-tRNA no sítio A.

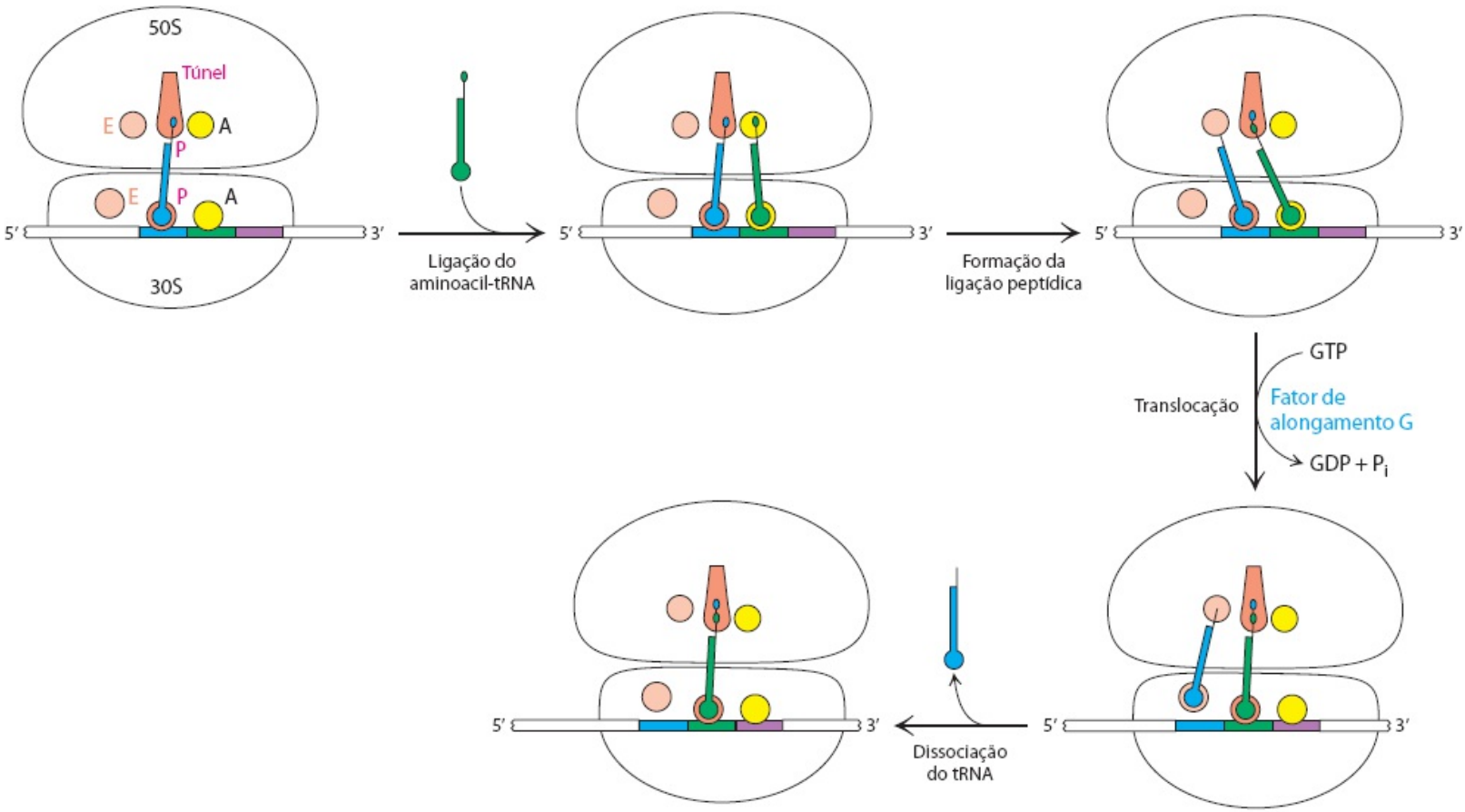


Figura 30.23 Mecanismo de síntese de proteínas. O ciclo começa com o peptidil-tRNA no sítio P. Um aminoacil-tRNA liga-se ao sítio A. Com ambos os sítios ocupados, forma-se uma nova ligação peptídica. Os tRNA e o mRNA são translocados pela ação do fator de alongamento G, que move o tRNA desacilado para o sítio E. Uma vez nesse local, o tRNA está livre para se dissociar e completar o ciclo.

Observe que *a cadeia peptídica permanece no sítio P na subunidade 50S durante todo esse ciclo*, crescendo no túnel de saída. Esse ciclo se repete, com a tradução do mRNA no sentido 5′ → 3′, à medida que novos aminoacil-tRNA se movem para dentro do sítio A, possibilitando o alongamento do polipeptídio até que seja encontrado um sinal de terminação.

O sentido da tradução tem consequências importantes. Convém lembrar que a transcrição também ocorre no sentido 5′ → 3′ (Seção 29.1). Se o sentido da tradução fosse oposto ao da transcrição, apenas o mRNA totalmente sintetizado poderia ser traduzido. Em contraste, como o sentido é o mesmo, o mRNA pode ser traduzido enquanto está sendo sintetizado. Nos procariotos, quase nenhum

tempo é perdido entre a transcrição e a tradução. A extremidade 5′ do mRNA interage com ribossomos logo após a sua síntese, muito antes do término da extremidade 3′ da molécula de mRNA. *Uma característica importante da expressão gênica dos procariotos é que a tradução e a transcrição estão estreitamente acopladas no espaço e no tempo*.

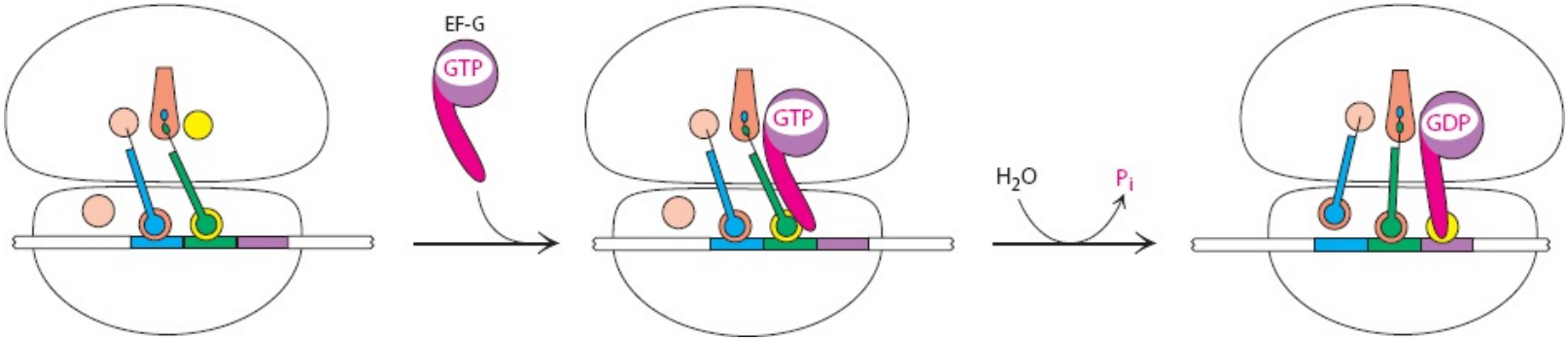


Figura 30.24 Mecanismo de translocação. Na forma com GTP, o EF-G liga-se ao sítio de ligação de EF-Tu na subunidade 50S. Esta ligação estimula a hidrólise do GTP, induzindo uma mudança de conformação em EF-G que força os tRNA e o mRNA a se moverem pelo ribossomo por uma distância que corresponde a um códon.

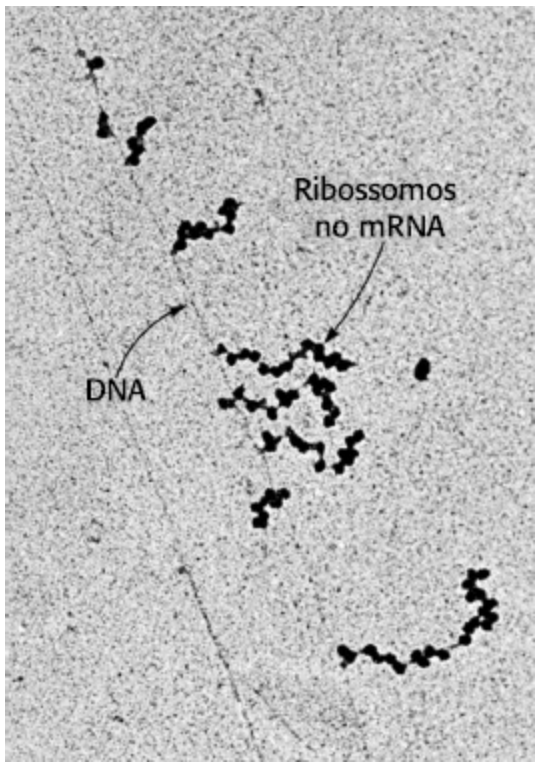
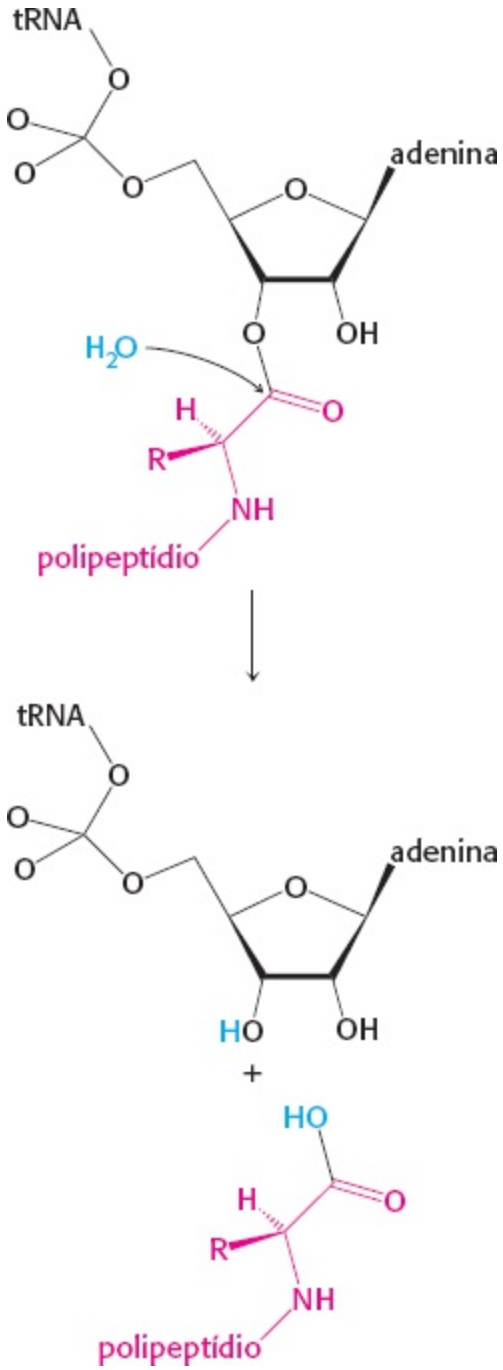


Figura 30.25 Polissomos. A transcrição de um segmento de DNA de *E. coli* gera moléculas de mRNA que são imediatamente traduzidas por múltiplos ribossomos. [De O. L. Miller., Jr., B. A. Hamkalo, and C.A. Thomas, Jr. Science 169:392-395, 1970.]

Muitos ribossomos podem estar traduzindo uma molécula de mRNA simultaneamente. Essa síntese paralela aumenta acentuadamente a eficiência da tradução do mRNA. O grupo de ribossomos ligados a uma molécula de mRNA é denominado *polirribossomo*, ou *polissomo* (Figura 30.25). Pesquisas recentes mostram que os ribossomos estão dispostos de modo a proteger o mRNA e a facilitar a troca dos substratos e produtos com citoplasma. Os ribossomos no polissomo encontram-se em uma disposição helicoidal ao redor do mRNA, com os sítios de ligação do tRNA e o túnel de saída do peptídio expostos ao citoplasma.

A síntese de proteínas é terminada por fatores de liberação que fazem a leitura dos códons de terminação

A fase final da tradução é o término. Como a síntese de uma cadeia peptídica chega a um final quando encontra um códon de terminação? Nas células normais, não existem tRNA com anticódons complementares aos códons de terminação UAA, UGA ou UAG. Em seu lugar, esses *códons de terminação são reconhecidos por proteínas denominadas fatores de liberação* (RF, *do inglês release factors*). Um desses fatores de liberação, o RF1, reconhece UAA ou UAG. Um segundo fator, o RF2, reconhece UAA ou UGA. Um terceiro fator, o RF3, outra GTPase, medeia interações entre o RF1 ou o RF2 e o ribossomo.



O RF1 e o RF2 são proteínas compactas que, nos eucariotos, assemelham-se a uma molécula de tRNA. Quando ligadas ao ribossomo, as proteínas são desenoveladas e fazem uma ponte na lacuna existente entre o códon determinação no mRNA e o centro de peptidil transferase na subunidade 50S

(Figura 30.26). O RF interage com o centro de peptidil transferase com uma alça contendo uma sequência altamente conservada de glicina-glicina-glutamina (GGQ) com a glutamina metilada no átomo de nitrogênio amida do grupo R. Essa glutamina modificada é fundamental para promover, auxiliada pela peptidil transferase, o ataque de uma molécula de água à ligação éster entre o tRNA e a cadeia polipeptídica, liberando a cadeia polipeptídica. O polipeptídio livre deixa o ribossomo. O RNA transportador e o RNA mensageiro permanecem ligados ao ribossomo 70S por um breve período até que todo o complexo seja dissociado pela hidrólise do GTP em resposta à ligação do EF-G e de outro fator, denominado *fator de liberação do ribossomo* (RRF, *do inglês ribosome release factor*).

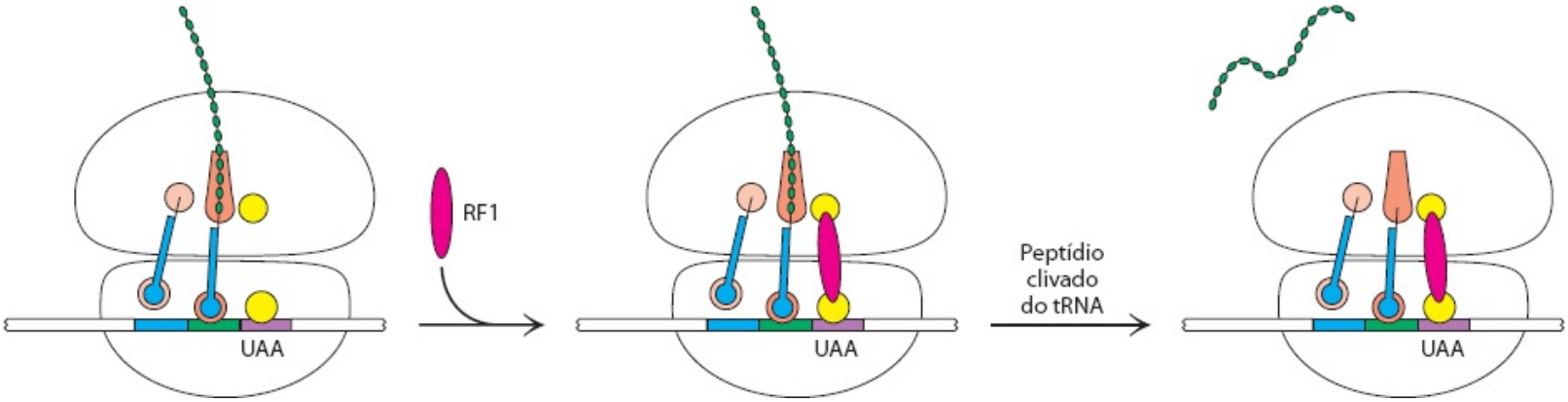


Figura 30.26 Término da síntese de proteínas. Um fator de liberação reconhece um códon de terminação no sítio A e estimula a liberação da proteína completa do tRNA no sítio P.

30.4 A síntese de proteínas pelos eucariotos difere da síntese procariótica basicamente no início da tradução

O plano básico de síntese de proteínas nos eucariotos e nos arqueas assemelha-se ao das bactérias. Os principais temas estruturais e de mecanismo se repetem em todos os domínios da vida. Entretanto, a síntese de proteínas nos eucariotos envolve mais componentes proteicos do que a síntese de proteínas nos procariotos, e algumas etapas são mais complexas. Algumas semelhanças e diferenças notáveis são as seguintes:

1. *Ribossomo*. Os ribossomos eucarióticos são maiores. São constituídos de uma subunidade grande 60S e de uma subunidade menor 40S, que se unem para formar uma partícula 80S com massa de 4.200 kDa, em comparação com uma massa de 2.700 kDa para o ribossomo 70S procariótico. A subunidade 40S contém um RNA 18S que é homólogo ao RNA 16S procariótico. A subunidade 60S contém três RNA: o RNA 5S, que é homólogo ao 5S procariótico; o RNA 28S, que é homólogo às moléculas 23S procarióticas; e o RNA 5,8S, que é homólogo à extremidade 5′ do RNA 23S dos procariotos.

2. *tRNA iniciador*. Nos eucariotos, o aminoácido iniciador é a metionina, em lugar da *N*-formilmetionina. Entretanto, à semelhança dos procariotos, um tRNA especial participa do processo de iniciação. Esse aminoacil-tRNA é denominado Met-$tRNA_i$ ou Met-$tRNA_f$ (o subscrito "i" indica a iniciação, enquanto "f" indica que ele pode ser formilado *in vitro*).

3. *Iniciação*. O códon de iniciação dos eucariotos é sempre AUG. Os eucariotos, diferentemente dos

procariotos, não têm uma sequência específica rica em purina no lado 5′ para distinguir os AUG iniciadores dos internos. Em vez disso, o AUG mais próximo da extremidade 5′ do mRNA é habitualmente selecionado como sítio de iniciação. Um ribossomo 40S, com um Met-$tRNA_i$ ligado, fixa-se ao *cap* na extremidade 5′ do mRNA eucariótico (Seção 29.3) e procura um códon AUG, movendo-se passo a passo na direção 3′ (Figura 30.27). Esse processo de varredura é catalisado por helicases, que se movem ao longo do mRNA acionadas pela hidrólise do ATP. O pareamento do anticódon do Met-$tRNA_f$ com o códon AUG do mRNA assinala que o alvo foi encontrado. Em quase todos os casos, o mRNA eucariótico tem apenas um sítio de iniciação e, portanto, é o molde para uma única proteína. Em contrapartida, um mRNA procariótico pode ter múltiplas sequências de Shine-Dalgarno e, portanto, sítios de início, podendo atuar como molde para a síntese de várias proteínas.

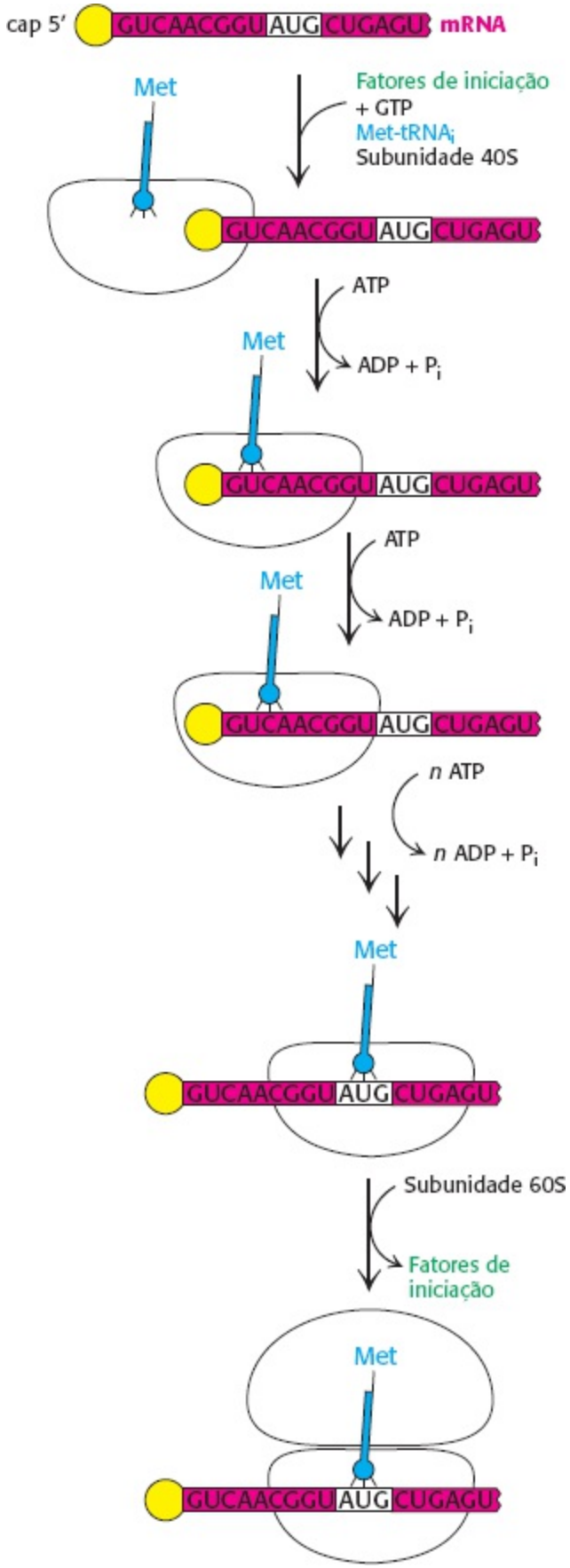


Figura 30.27 Iniciação da tradução nos eucariotos. Nos eucariotos, a iniciação da tradução começa com a montagem de um complexo no *cap* 5′, que inclui a subunidade 40S e o Met-tRNA$_i$. Acionado pela hidrólise do ATP, esse complexo percorre o mRNA até alcançar o primeiro AUG. A subunidade 60S é então acrescentada para formar o complexo de iniciação 80S.

Os eucariotos utilizam muito mais fatores de iniciação do que os procariotos, e a sua interação é muito mais complexa. O prefixo *eIF* denota um fator de iniciação eucariótico. Por exemplo, o eIF-4E

é uma proteína que se liga diretamente ao *cap* de 7-metilguanosina (Seção 29.3), enquanto eIF-2, em associação ao GTP, transporta o met-tRNA$_i$ até o ribossomo. A diferença no mecanismo de iniciação entre procariotos e eucariotos é, em parte, uma consequência na diferença no processamento do RNA. A extremidade 5′ do mRNA está prontamente disponível aos ribossomos imediatamente após a transcrição nos procariotos. Em contrapartida, nos eucariotos, o pré-mRNA precisa ser processado e transportado para o citoplasma antes da tradução ser iniciada. O cap 5′ fornece um ponto de iniciação facilmente reconhecível. Além disso, a complexidade da iniciação da tradução nos eucariotos fornece outro mecanismo para a regulação da expressão gênica, que iremos discutir com mais pormenores no Capítulo 31.

Embora a maioria das moléculas de mRNA eucarióticos dependa do *cap* 5′ para iniciar a síntese de proteínas, pesquisas recentes estabeleceram que algumas moléculas de mRNA podem recrutar ribossomos para a iniciação, sem o uso de um cap 5′ e de proteínas de ligação do cap. Nesses mRNA, sequências de RNA altamente estruturadas, denominadas sítios de entrada internos do ribossomo (IRES, do inglês *internal ribosome entry sites*), facilitam a ligação do ribossomo 40S ao mRNA. Os IRES foram descobertos pela primeira vez nos genomas de vírus de RNA e, desde então, foram encontrados em outros vírus, bem como em um subgrupo de mRNA celular que parece participar no desenvolvimento e estresse celular. O mecanismo molecular pelo qual os IRES funcionam para iniciar a síntese de proteínas ainda não foi estabelecido.

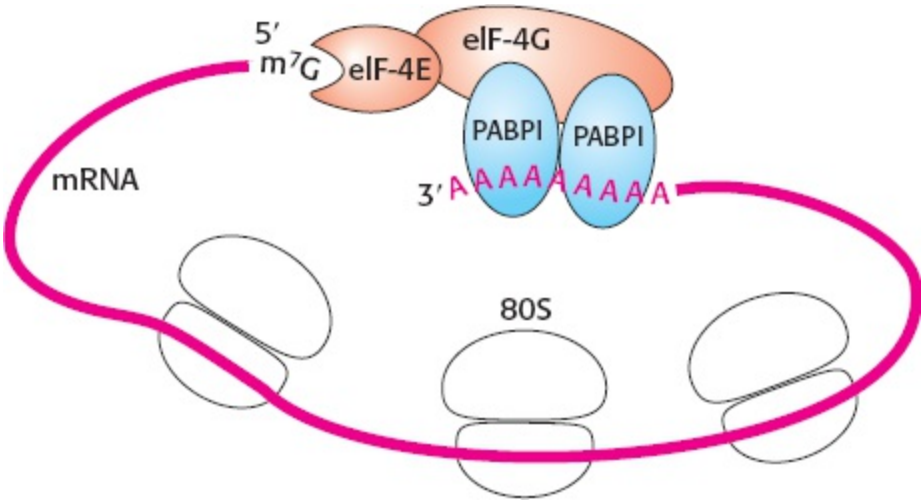


Figura 30.28 As interações de proteínas tornam circular o mRNA eucariótico. [De H. Lodish *et al.*, *Molecular Cell Biology*, 5th ed. (W. H. Freeman and Company, 2004), Fig. 4.31.]

4. *A estrutura do mRNA.* O mRNA eucariótico com cap 5′ é circular. A proteína eIF-4E que se liga à estrutura cap do mRNA também se liga à cauda poli(A) por meio de duas proteínas intermediárias. O eIF-4E que já está ligado ao cap liga-se, então, à proteína eIF-4G que, por sua vez, liga-se a uma proteína associada à cauda poli(A), a proteína de ligação de poli(A) (PABPI, *do inglês poly(A)-binding protein* ; Figura 30.28). Por conseguinte, o cap e a cauda são reunidas, formando um círculo de mRNA. A estrutura circular pode facilitar a religação dos ribossomos após o término da síntese de proteínas. A regulação da atividade do eIF-4G constitui um ponto de controle essencial em condições normais e patológicas. A alteração da função do eIF-4G foi implicada na síndrome do X frágil, a forma mais comum de comprometimento metal hereditário, bem como no câncer de próstata e em outros tipos de câncer.

5. *Alongamento e término*. Os fatores de alongamento eucarióticos EF1α e EF1βγ são as contrapartes dos EF-Tu e dos EF-Ts dos procariotos. A forma do EF1α com GTP leva o aminoacil-tRNA até o sítio A do ribossomo, enquanto o EF1βγ catalisa a troca de GTP pelo GDP ligado. O EF2 eucariótico medeia a translocação acionada pelo GTP de modo muito semelhante ao EF-G procariótico. A terminação nos eucariotos é efetuada por um único fator de liberação, o eRF1 em comparação com dois fatores nos eucariotos. Por fim, o eIF-3, como a sua contraparte procariótica IF3, impede a reassociação das subunidades ribossômicas na ausência de um complexo de iniciação.

6. *Organização*. Os componentes do mecanismo de tradução nos eucariotos superiores estão organizados em grandes complexos associados ao citoesqueleto. Acredita-se que essa associação facilite a eficiência da síntese de proteínas. Convém lembrar que a organização de processos bioquímicos elaborados em complexos físicos é um tema recorrente em bioquímica (Seção 18.5 e Seção 25.2).

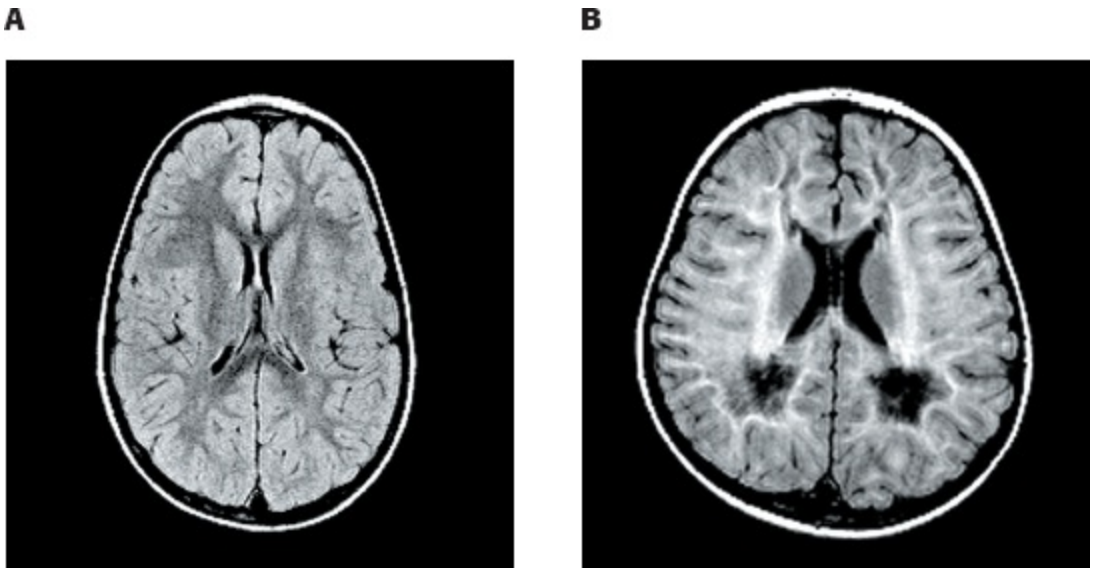


Figura 30.29 Os efeitos da doença da substância branca evanescente. **A**. No cérebro normal a ressonância nuclear magnética (RNM) de imagem visualiza a substância branca como-cinza escuro. **B**. Na presença de doença cerebral, a RM revela que a substância branca é substituída por líquido cerebrospinal, que aparece em branco. [(A) Cortesia de Marjo S. van der Knaap, M.D., PhD., VU University Medical Center, The Netherlands. (B) M. S. van der knapp *et al*., *Lancet Neurology* 5:413-423.]

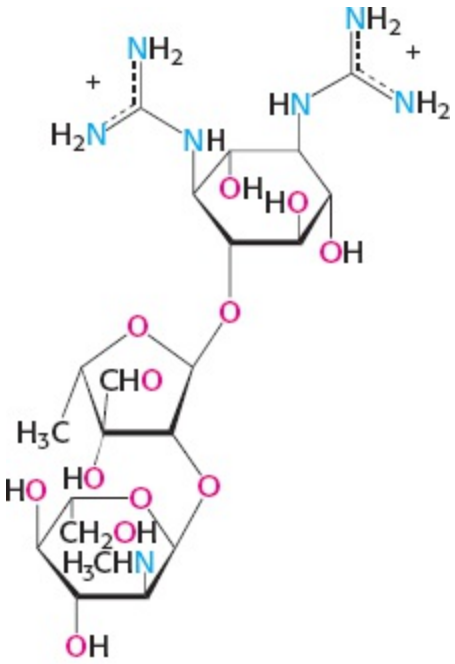
As mutações no fator de iniciação 2 provocam uma condição patológica curiosa

O eIF4-G defeituoso não é o único fator de iniciação que resulta em condições patológicas. As mutações no fator de iniciação 2 eucariótico resultam em uma doença misteriosa, denominada *doença da substância branca evanescente* (SBE), em que as células nervosas do cérebro desaparecem e são substituídas por líquido cerebrospinal (Figura 30.29). A substância branca do cérebro consiste predominantemente em axônios que conectam a substância cinzenta do cérebro ao restante do corpo. A morte, que resulta de febre ou coma prolongado, pode ocorrer a qualquer momento, desde alguns anos até décadas após o início da manifestação da doença, habitualmente em crianças pequenas, mas possivelmente pouco depois do nascimento ou até mesmo na vida adulta. Um aspecto particularmente enigmático da doença é a sua especificidade tecidual. Uma mutação em um processo bioquímico tão fundamental para a vida quanto a iniciação da síntese de proteínas seria presumivelmente letal ou pelo menos afetaria todos os tecidos do corpo. Doenças como a da SBE

mostram graficamente que, embora tenha havido muitos progressos em bioquímica, é necessário realizar muito mais pesquisas para compreender as complexidades da saúde e da doença.

30.5 Vários antibióticos e toxinas podem inibir a síntese de proteínas

Foram identificadas muitas substâncias químicas que inibem muitos aspectos da síntese de proteínas. Essas substâncias químicas são poderosas ferramentas experimentais e fármacos clinicamente úteis.



Estreptomicina

Alguns antibióticos inibem a síntese de proteínas

As diferenças entre os ribossomos eucarióticos e procarióticos podem ser exploradas para o desenvolvimento de antibióticos (Tabela 30.4). Por exemplo, o antibiótico *estreptomicina*, um trissacarídio altamente básico, interfere na ligação do fMet-tRNA aos ribossomos nos procariotos e, portanto, impede a iniciação correta da síntese de proteínas. Outros antibióticos *aminoglicosídicos*, como a neomicina, a canamicina e a gentamicina, interferem na interação entre o tRNA e o rRNA 16S da subunidade 30S (p. 898) dos ribossomos procarióticos. O *cloranfenicol* atua inibindo a atividade da peptidil transferase. A *eritromicina* liga-se à subunidade 50S e bloqueia a translocação.

Tabela 30.4 Inibidores antibióticos da síntese de proteínas.

Antibiótico	Ação
Estreptomicina e outros aminoglicosídios	Inibem a iniciação e provocam a leitura incorreta do mRNA (procariotos)
Tetraciclina	Liga-se à subunidade 30S e inibe a ligação dos aminoacil-tRNA (procariotos)
Cloranfenicol	Inibe a atividade de peptidil transferase da subunidade ribossômica 50S (procariotos)
Cicloeximida	Inibe a translocação (eucariotos)

Eritromicina	Liga-se à subunidade 50S e inibe a translocação (procariotos)
Puromicina	Causa o término prematuro da cadeia, atuando como análogo do aminoacil-tRNA (procariotos e eucariotos)

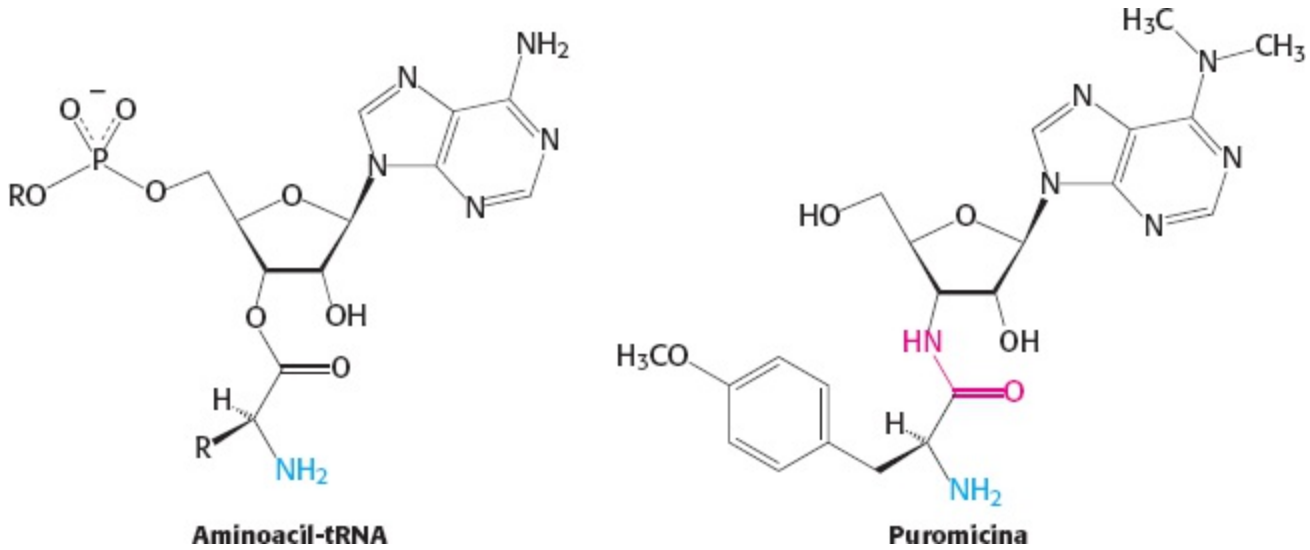


Figura 30.30 Ação antibiótica da puromicina. A puromicina assemelha-se ao aminoacil terminal de um aminoacil-tRNA. Seu grupo amino une-se ao grupo carboxila da cadeia polipeptídica em crescimento, formando um produto de adição que se dissocia do ribossomo. Esse produto de adição é estável, visto que a puromicina tem uma ligação amida (mostrada em vermelho) em lugar de uma ligação éster.

O antibiótico *puromicina* inibe a síntese de proteínas tanto nos procariotos quanto nos eucariotos, causando a liberação das cadeias polipeptídicas nascentes antes de a sua síntese estar completa. A puromicina é um análogo da parte terminal do aminoacil-tRNA (Figura 30.30). O fármaco liga-se ao sítio A do ribossomo e inibe a entrada do aminoacil-tRNA. Além disso, a puromicina contém um grupo α-amino. Esse grupo amino, como o do aminoacil-tRNA, forma uma ligação peptídica com o grupo carboxila da cadeia peptídica em crescimento. O produto, um peptídio que tem um resíduo de puromicina ligado covalentemente em sua extremidade carboxila, dissocia-se do ribossomo. A puromicina, que não é mais utilizada como medicamento, é empregada principalmente como ferramenta experimental na pesquisa da síntese de proteínas. A *cicloeximida*, outro antibiótico, bloqueia a translocação nos ribossomos eucarióticos; por esse motivo, trata-se de uma ferramenta laboratorial útil para bloquear a síntese de proteínas em células eucarióticas.

A toxina diftérica bloqueia a síntese de proteínas nos eucariotos ao inibir a translocação

Muitos antibióticos, obtidos de procariotos para fins medicinais, são inibidores da síntese de proteínas dos procariotos. Entretanto, alguns procariotos produzem inibidores da síntese de proteínas que inibem a síntese proteica dos eucariotos, resultando em doenças como a difteria, que era uma importante causa de morte em crianças antes do advento da imunização efetiva. Os sintomas da difteria consistem em faringite dolorosa, rouquidão, febre e dificuldade na respiração. Os efeitos letais dessa doença são devidos principalmente a uma toxina proteica produzida pelo *Corynebacterium diphtheriae*, uma bactéria que cresce nas vias respiratórias superiores do indivíduo infectado. Alguns microgramas da toxina diftérica são habitualmente letais em um individuo não imunizado, visto que inibem a síntese de proteínas. Pouco depois de entrar em uma

célula-alvo, a toxina é clivada em um fragmento A de 21 kDa e em um fragmento B de 40 kDa. O fragmento A da toxina catalisa a modificação covalente do fator do alongamento 2, o fator que catalisa a translocação nas sínteses de proteínas dos eucariotos, enquanto o fragmento B possibilita a entrada do fragmento A no citoplasma da célula-alvo.

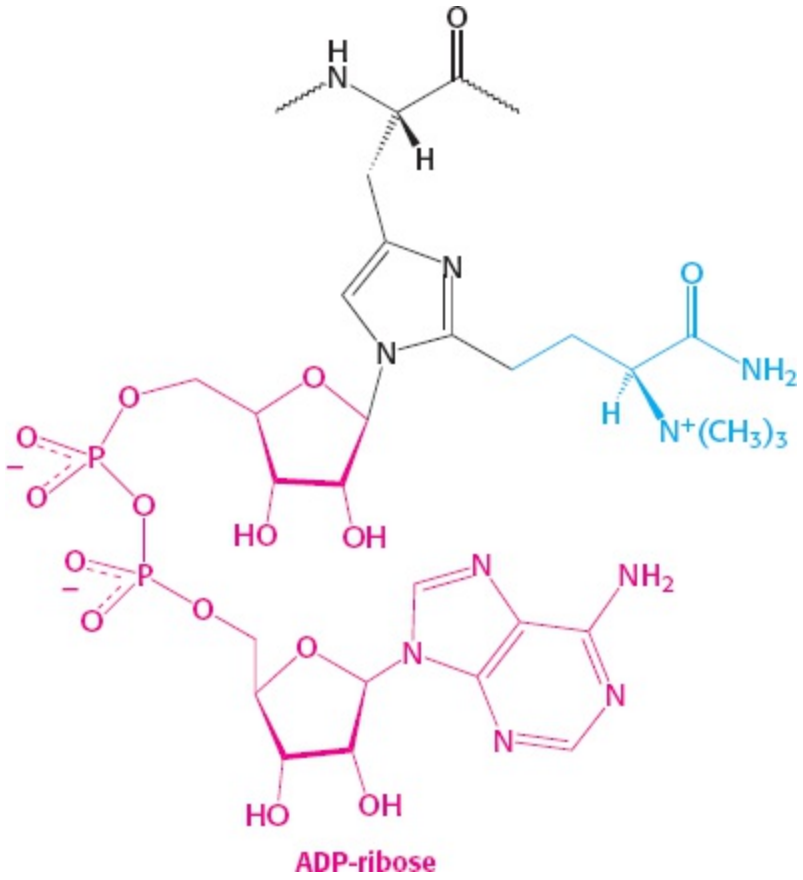


Figura 30.31 Bloqueio da translocação pela toxina diftérica. A toxina diftérica bloqueia a síntese de proteínas nos eucariotos, catalisando a transferência de uma unidade de ADP-ribose do NAD^+ para a diftamida, um resíduo de aminoácido modificado no fator de alongamento 2 (translocase). A diftamida é formada pela modificação pós-traducional (em azul) de um resíduo de histidina.

Um único fragmento A da toxina no citoplasma pode matar a célula. Por que ele é tão letal? O EF2 contém *diftamida*, um resíduo de aminoácido incomum de função desconhecida, que é formado pela modificação pós-traducional da histidina. O fragmento A da toxina diftérica catalisa a transferência de ADP ribose do NAD^+ para o anel da diftamida (Figura 30.31). *Essa ADP ribosilação de uma única cadeia lateral do EF2 bloqueia a sua capacidade de efetuar a translocação da cadeia polipeptídica em crescimento*. A síntese de proteínas cessa, explicando a acentuada toxicidade da toxina diftérica.

A ricina modifica fatalmente o RNA ribossômico 28S

A ricina é uma biomolécula que aparece frequentemente nos noticiários, em virtude de seu uso potencial como agente de bioterrorismo. A ricina é uma pequena proteína (65 kDa) encontrada nas sementes da mamona, *Ricinus communis* (Figura 30.32). Trata-se, de fato, de uma molécula mortal, visto que apenas 500 μg são letais para um ser humano adulto, e uma única molécula pode inibir toda a síntese de proteínas em uma célula, resultando em morte celular.

A ricina é uma proteína heterodimérica composta de uma cadeia A catalítica unida por uma única

ponte de dissulfeto a uma cadeia B. A cadeia B possibilita a ligação da toxina à célula-alvo, e essa ligação resulta na captação endocitótica do dímero e liberação final da cadeia A no citoplasma. A cadeia A cliva a adenina de um adenosina nucleotídio particular no rRNA 28S. A remoção da base adenina inativa por completo o ribossomo, impedindo a ligação dos fatores de alongamento. Por conseguinte, tanto a ricina quanto a toxina diftérica atuam inibindo o alongamento na síntese de proteínas. A ricina tem esse efeito quando modifica covalentemente o rRNA, e a toxina diftérica quando modifica, também covalentemente, o fator de alongamento.

Figura 30.32 Mamona. As sementes mamona de *Ricinus communis* constituem uma fonte rica de óleos com ampla variedade de aplicações, incluindo a produção de combustíveis biodiesel. As sementes também são ricas na toxina ricina. [Ted Kinsman/Photo Researchers.]

30.6 Os ribossomos ligados ao retículo endoplasmático fabricam proteínas secretoras e de membrana

Uma proteína recém-sintetizada em *E. coli* pode permanecer no citoplasma, ou pode ser transportada até a membrana plasmática, a membrana externa, o espaço entre elas ou o meio extracelular. As células eucarióticas podem dirigir as proteínas para locais internos, como lisossomos, mitocôndrias, cloroplastos e núcleos. Como essa seleção é efetuada? Nos eucariotos, uma escolha fundamental é feita logo após o início da síntese de uma proteína. O destino final de uma proteína depende, em grande parte, da localização do ribossomo no qual está sendo sintetizada?

Nas células eucarióticas, um ribossomo permanece livre no citoplasma, a não ser que seja direcionado para o *retículo endoplasmático* (RE), o extenso sistema de membranas que constitui cerca da metade do total de membranas de uma célula. A região que se liga aos ribossomos é denominada *RE rugoso*, visto que tem uma aparência rugosa, diferentemente do *RE liso*, que é desprovido de ribossomos (Figura 30.33). Os ribossomos livres sintetizam proteínas que permanecem dentro das células, seja dentro do citoplasma ou direcionados para organelas delimitadas por uma dupla membrana, como o núcleo, as mitocôndrias e os cloroplastos. Os ribossomos ligados ao RE habitualmente sintetizam proteínas destinadas a sair da célula, ou, pelo menos, a estabelecer contato com o exterior da célula a partir de uma posição na membrana celular. Essas proteínas são divididas em três classes principais: *proteínas secretoras* (proteínas exportadas

pela célula), *proteínas lisossômicas* e *proteínas que se estendem pela membrana plasmática*. Praticamente todas as proteínas integrais da membrana da célula, com a exceção daquelas localizadas nas membranas das mitocôndrias e dos cloroplastos, são formadas por ribossomos ligados ao RE.

Diversas estratégias são utilizadas para enviar as proteínas sintetizadas por ribossomos livres até o núcleo, os peroxissomos, as mitocôndrias e os cloroplastos das células eucarióticas. Entretanto, nesta seção, abordaremos o endereçamento das proteínas produzidas por ribossomos ligados ao retículo endoplasmático.

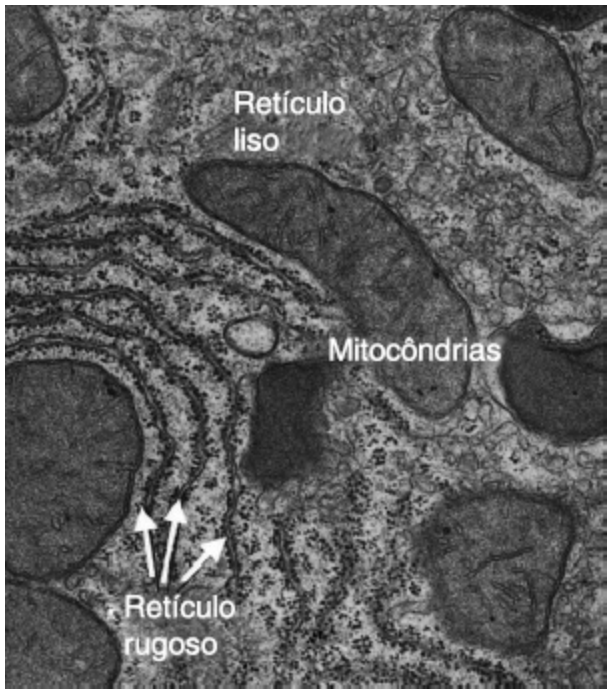


Figura 30.33 Os ribossomos ligam-se ao retículo endoplasmático. Nessa micrografia eletrônica, os ribossomos aparecem como pequenos pontos negros ligados ao lado citoplasmático do retículo endoplasmático, dando um aspecto rugoso. Em contrapartida, o retículo endoplasmático liso é desprovido de ribossomos. [De G. K. Voletz, M. M. Rolls, and T. A. Rapoport, *EMBO Rep*. 3:944-950, 2002.]

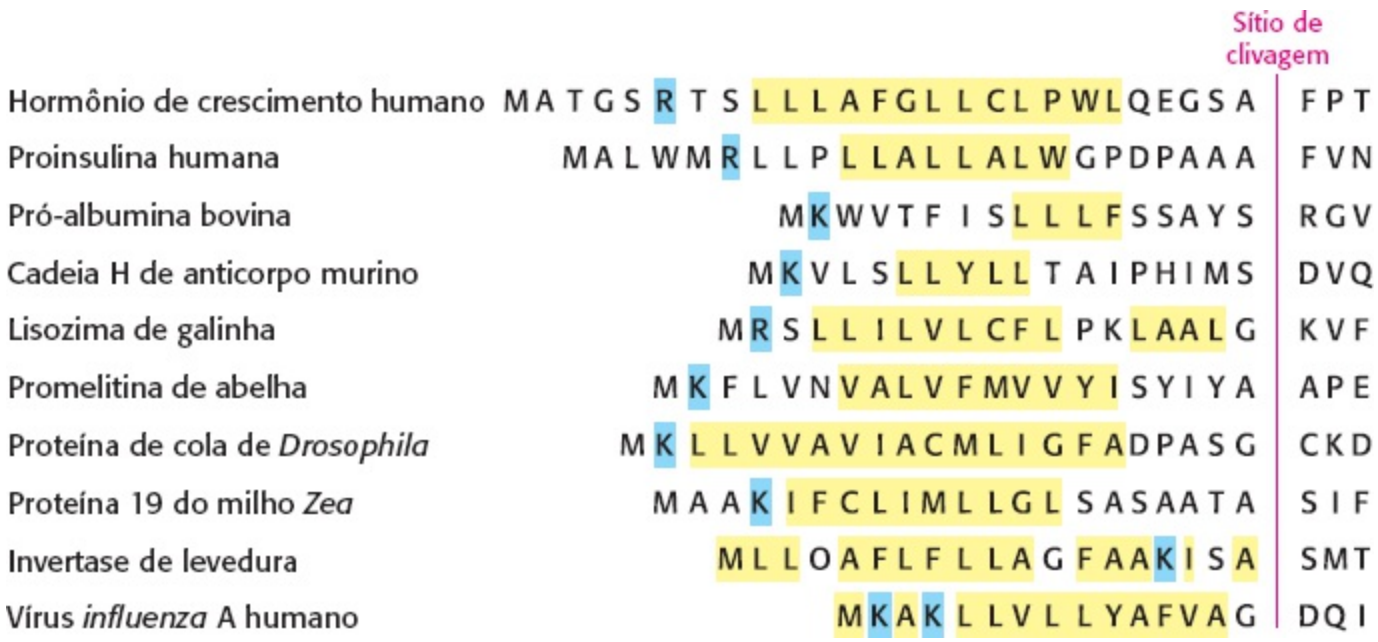


Figura 30.34 Sequências sinal aminoterminais de algumas proteínas secretoras e da membrana plasmática dos eucariotos. O cerne hidrofóbico (em amarelo) é precedido de resíduos básicos (em azul) e seguido de um sítio de

clivagem (em vermelho) para a peptidase sinal.

As sequências sinal marcam proteínas para translocação através da membrana do retículo endoplasmático

A síntese de proteínas destinadas a sair da célula ou a ser inseridas na membrana plasmática começa em ribossomo livre; entretanto, pouco depois do início da síntese, ela é interrompida até que o ribossomo seja direcionado para o lado citoplasmático do retículo endoplasmático. Quando o ribossomo é atracado na membrana do RE, a síntese de proteínas começa novamente. À medida que a cadeia peptídica recém-formada sai do ribossomo, ela é transportada durante a tradução através da membrana para o lúmen do retículo endoplasmático.

Os ribossomos livres que estão sintetizando proteínas para uso nas células são idênticos àqueles ligados ao RE. Qual é o processo que dirige o ribossomo que está sintetizando uma proteína destinada a entrar no RE para se ligar ao RE? A translocação consiste em quatro componentes.

1. *A sequência sinal*. A sequência sinal é *uma sequência de 9 a 12 resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, contendo, algumas vezes, aminoácidos de carga positiva* (Figura 30.34). Essa sequência situa-se habitualmente perto da extremidade aminoterminal da cadeia polipeptídica nascente. A presença da sequência sinal identifica o peptídio nascente como um peptídio que precisa cruzar a membrana do RE. Algumas sequências sinal são mantidas na proteína madura, enquanto outras são clivadas por uma peptidase sinal no lado luminal da membrana do RE (ver Figura 30.36).

2. *A partícula de reconhecimento de sinal (SRP, do inglês signal recognition particle)*. A partícula de reconhecimento de sinal reconhece a sequência sinal e liga-se à sequência e ao ribossomo tão logo a sequência sinal saia do ribossomo. A seguir, a SRP orienta o ribossomo e a sua cadeia polipeptídica nascente para a membrana do RE. A SRP é uma ribonucleoproteína constituída de um RNA 7S e seis proteínas diferentes (Figura 30.35). Uma proteína, a SRP54, é uma GTPase crucial para o funcionamento da SRP. A SRP liga-se a todos os ribossomos, porém liga-se firmemente apenas aos ribossomos que exibem a sequência sinal. O SRP examina os ribossomos até localizar um que exiba uma sequência sinal. Após a ligação da SRP à sequência sinal, as interações entre o ribossomo e a SRP ocupam o sítio de ligação do fator de alongamento, interrompendo, assim, a síntese de proteínas.

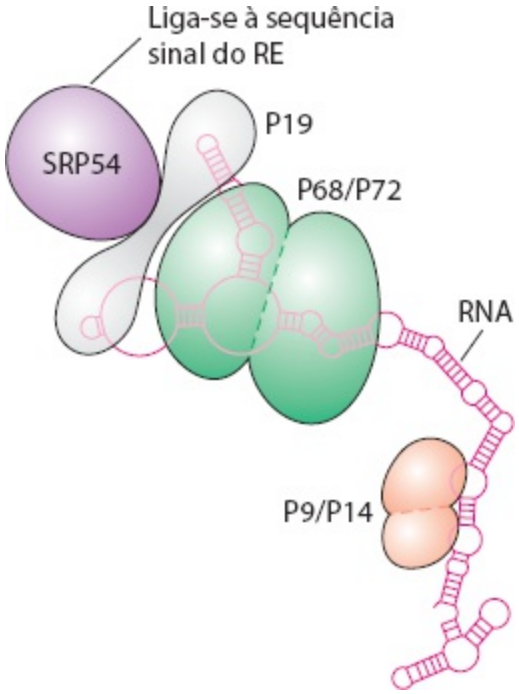


Figura 30.35 Partícula de reconhecimento de sinal. A partícula de reconhecimento de sinal (SRP) é constituída de seis proteínas (uma das quais é SRP54) e de uma molécula de RNA de 300 nucleotídios. O RNA tem uma estrutura complexa com muitos segmentos em dupla-hélice intercalados por regiões de fita simples, mostradas como círculos. [De H. Lodish *et al*., Molecular Cell Biology, 5th ed. (W. H. Freeman and Company, 2004). Ver K. Strub *et al*., Mol. Cell Biol. 11:3949-3959, 1991 e S. High and B. Dobberstein, *J. Cell Biol*. 113:229-233, 1991.]

3. *O receptor de SRP (SR)*. O complexo SRP-ribossomo difunde-se para o retículo endoplasmático, onde a se SRP liga-se ao receptor de SRP, uma proteína integral de membrana constituída de duas subunidades, SRα e SRβ. A subunidade SRα é, como a SRP54, uma GTPase.

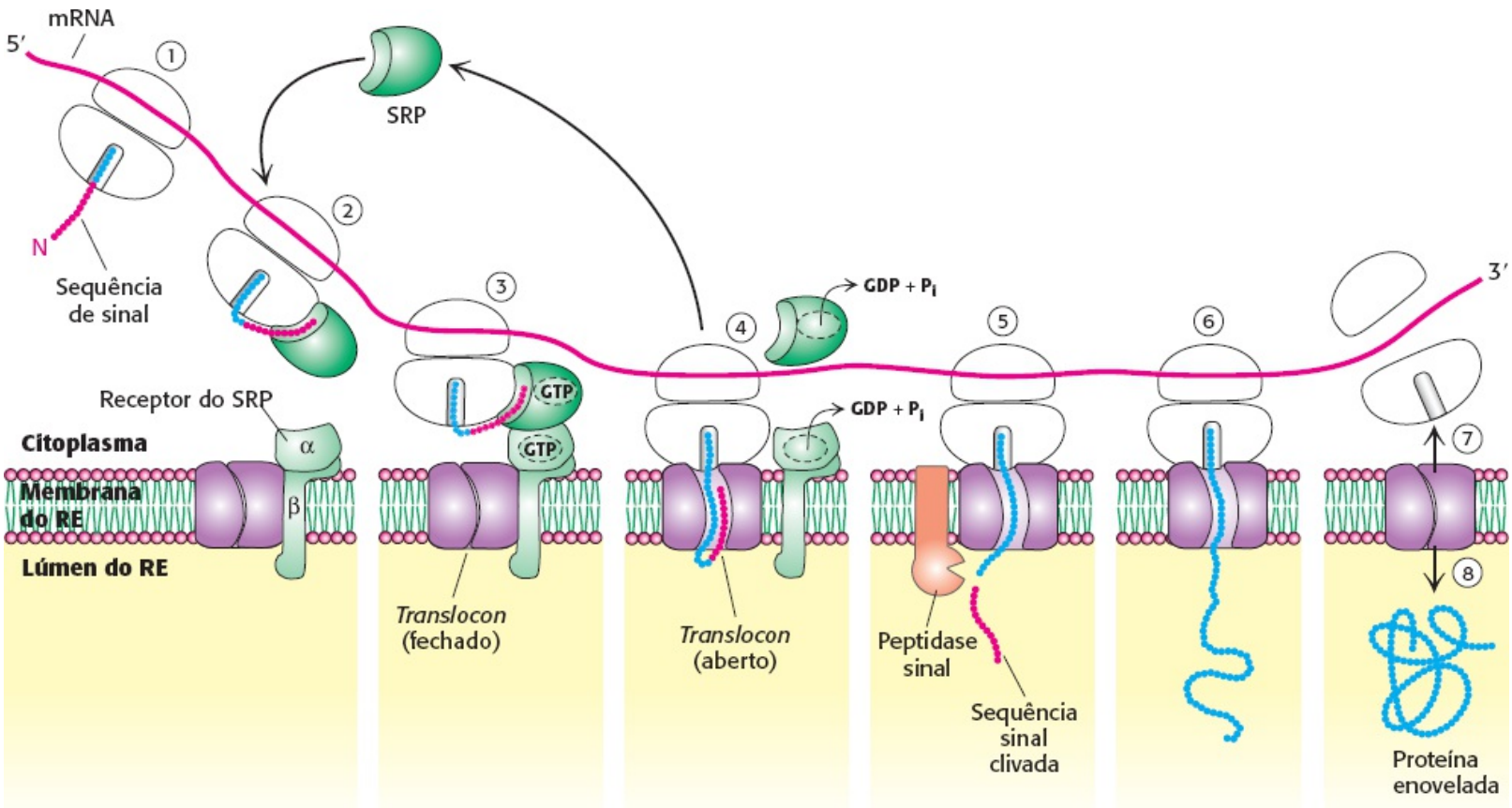


Figura 30.36 Ciclo de endereçamento do SRP. (1) A síntese de proteínas começa nos ribossomos livres. (2) Após a

sequência sinal ter saído do ribossomo, ela é ligada pela SRP, e a síntese de proteínas é interrompida. (3) O complexo SRP-ribossomo atraca com o receptor de SRP na membrana do RE. (4) A SRP e o seu receptor hidrolisam simultaneamente os GTP ligados. A síntese de proteínas recomeça, e a SRP está livre para se ligar a outra sequência sinal. (5) A peptidase sinal pode remover a sequência sinal quando entra no lúmen do RE. (6) A síntese de proteínas continua à medida que a proteína é sintetizada diretamente no RE. (7) Com o término da síntese de proteínas, o ribossomo é liberado. (8) O túnel de proteína no *translocon* se fecha. [De H. Lodish *et al*., *Molecular Cell Biology*, 5th ed. (W. H. Freeman and Company, 2004), Fig. 16.6.]

4. *O translocon*. O complexo SRP-SR leva o ribossomo até a membrana do RE. Na membrana, ocorre atracagem com a maquinaria de translocação, denominada *translocon*, uma montagem de múltiplas subunidades de proteínas de membrana integrais e periféricas. O translocon é um canal condutor de proteínas. Esse canal abre-se quando o translocon e o ribossomo se ligam um ao outro. A síntese de proteínas é reiniciada quando a cadeia polipeptídica em crescimento passa através do canal do *translocon* para o lúmen do RE.

As interações dos componentes da maquinaria de translocação são mostradas na Figura 30.36. Para que ocorra formação do complexo SRP-SR tanto a SRP54 quanto as subunidades SRα do SR devem ligar-se ao GTP. Em seguida, para que o complexo SRP-SR leve o ribossomo ao *translocon*, as duas moléculas de GTP – uma na SRP e outra no SR – são alinhadas em um sítio essencialmente ativo, compartilhado pelas duas proteínas. Após o ribossomo ter passado ao longo do *translocon*, os GTP são hidrolisados, a SRP e o SR dissociam-se, e a SRP fica livre para procurar outra sequência sinal e começar novamente o ciclo. Por conseguinte, a SRP atua de modo catalítico. A peptidase sinal que está associada ao *translocon* no lúmen do RE remove a sequência sinal da maioria das proteínas.

Vesículas de transporte carregam proteínas de carga até o seu destino final

À medida que as proteínas são sintetizadas, elas se enovelam para formar suas estruturas tridimensionais no lúmen do RE. Algumas proteínas são modificadas pela ligação de carboidratos de ligação N (Seção 11.3). Por fim, as proteínas devem ser distribuídas e transportadas até seus destinos finais. Independentemente do destino, os princípios do transporte são os mesmos. O transporte é mediado por *vesículas de transporte* que brotam a partir do retículo endoplasmático (Figura 30.7). As vesículas de transporte do RE levam a sua carga (as proteínas) até o complexo de Golgi, onde as vesículas se fundem e depositam a carga dentro do complexo. Nesse local, as proteínas de carga são modificadas – por exemplo, pela ligação de carboidratos. A partir do complexo de Golgi, as vesículas de transporte levam as proteínas de carga até seus destinos finais, como mostra a Figura 30.37.

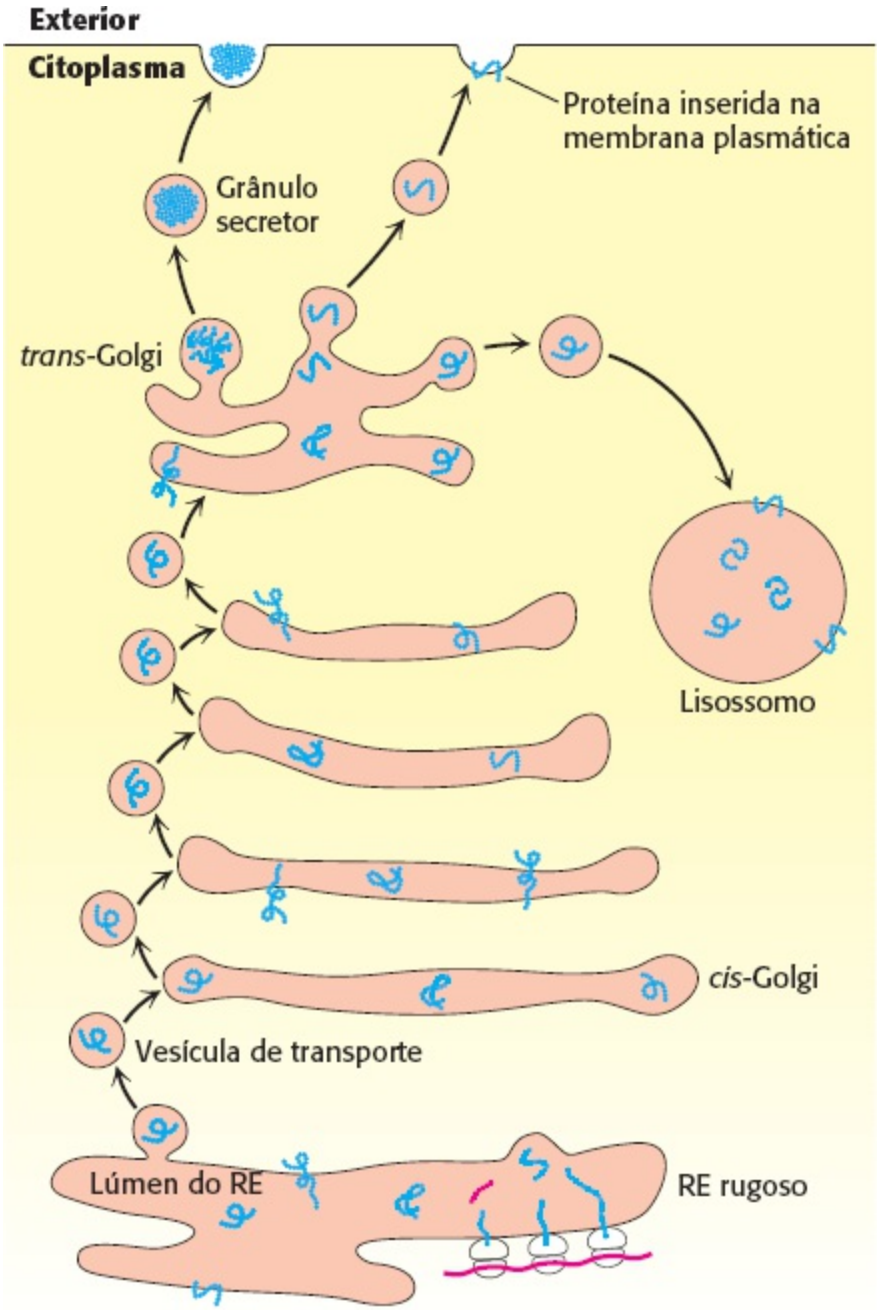


Figura 30.37 Vias de distribuição das proteínas. As proteínas recém-sintetizadas no lúmen do RE são coletadas em brotamentos da membrana. Esses brotamentos destacam-se, formando vesículas de transporte. As vesículas de transporte levam as proteínas de carga até o complexo de Golgi, onde são modificadas. Em seguida, as vesículas de transporte levam a sua carga até o destino final, direcionadas pelas proteínas v-SNARE e t-SNARE.

Como uma proteína chega a seu destino correto? Uma proteína recémsintetizada flutua no lúmen do RE até ligar-se a uma proteína de membrana integral, denominada *receptor de carga*. Essa ligação sequestra a proteína de carga em uma pequena região da membrana, que subsequentemente pode formar um brotamento. Esse brotamento transportará a proteína até um destino específico – a membrana plasmática, o lisossomo ou o exterior da célula. O aspecto essencial para assegurar que a proteína alcance o destino apropriado é a sua ligação a um receptor na região do RE associada ao destino da proteína. Para assegurar uma correspondência apropriada da proteína com a região do RE, os receptores de carga reconhecem diversas características da proteína de carga, como uma determinada sequência de aminoácidos ou carboidrato adicionado.

A formação de brotamentos é facilitada pela ligação de *proteínas de revestimento* (COP, *do inglês coat proteins*) ao lado citoplasmático do brotamento. As proteínas de revestimento associam-se umas

às outras para destacar a vesícula. Após a formação e liberação da vesícula de transporte, as proteínas de revestimento são liberadas para revelar outra proteína integral, denominada *v-SNARE* ("v" de vesícula). A v-SNARE liga-se a uma determinada *t-SNARE* ("t" de *target*, alvo) na membrana-alvo. Essa ligação leva à fusão da vesícula de transporte com a membrana-alvo, e a carga é então liberada. Por conseguinte, a atribuição de proteínas v-SNARE idênticas à mesma região da membrana do RE faz com que uma região do RE seja associada a um destino particular.

Resumo

30.1 A síntese de proteínas requer a tradução de sequências de nucleotídios em sequências de aminoácidos

A síntese de proteínas é denominada tradução, visto que a informação presente na forma de uma sequência de ácido nucleico é traduzida em uma linguagem diferente, a sequência de aminoácidos em uma proteína. Esse processo complexo é mediado pela interação coordenada de mais de uma centena de macromoléculas, incluindo mRNA, rRNA, tRNA, aminoacil-tRNA sintetases e fatores proteicos. Tendo em vista que uma proteína tipicamente é constituída de 100 a 1.000 aminoácidos, a frequência com a qual um aminoácido incorreto é incorporado durante o processo de síntese de proteínas precisa ser inferior a 10^{-4}. Os RNA transportadores são adaptadores que estabelecem a ligação entre um ácido nucleico e um aminoácido. Essas moléculas, que consistem em cadeias simples de cerca de 80 nucleotídios, têm uma estrutura em forma de L.

30.2 As aminoacil-RNA transportador sintetases fazem a leitura do código genético

Cada aminoácido é ativado e ligado a um RNA transportador específico por uma enzima denominada aminoacil-tRNA sintetase. Essa enzima liga o grupo carboxila de um aminoácido ao grupo hidroxila 2′ ou 3′ da unidade de adenosina de uma sequência CCA na extremidade 3′ do tRNA por uma ligação éster. Existe pelo menos uma aminoacil-tRNA sintetase específica e pelo menos um tRNA específico para cada aminoácido. A sintetase utiliza ambos os grupos funcionais e a forma de seu aminoácido relacionado para impedir a ligação de um aminoácido incorreto a um tRNA. Algumas sintetases apresentam um sítio ativo separado no qual os aminoácidos incorretamente ligados são removidos por hidrólise. A sintetase reconhece o anticódon, a haste aceptora e, algumas vezes, outras partes de seu substrato de tRNA. Ao reconhecer especificamente tanto os aminoácidos quanto os tRNA, as aminoacil-tRNA sintetases implementam a instrução do código genético.

Os códons do RNA mensageiro reconhecem os anticódons dos RNA transportadores, em lugar dos aminoácidos ligados aos tRNA. Um códon no mRNA forma pares de bases com o anticódon do tRNA. Alguns tRNA são reconhecidos por mais de um códon, visto que o pareamento da terceira base de um códon é menos crucial do que os outros dois (mecanismo de oscilação). Existem duas classes evolutivas distintas de sintetase, cada uma das quais reconhece dez aminoácidos. As duas classes reconhecem faces opostas das moléculas de tRNA.

30.3 O ribossomo constitui o local de síntese de proteínas

A síntese de proteínas ocorre nos ribossomos – partículas de ribonucleoproteínas (cerca de dois

terços de RNA e um terço de proteína) constituídas de subunidades grandes e pequenas. Em *E. coli*, o ribossomo 70S (2.500 kDa) é constituído de subunidades 30S e 50S. A subunidade 30S consiste em RNA ribossômico 16S e 21 proteínas diferentes; a subunidade 50S é constituída de rRNA 23S e 5S e 34 proteínas diferentes. O ribossomo inclui três sítios para a ligação do tRNA, denominados sítio A (aminoacil), sítio P (peptidil) e sítio E (saída).

A síntese de proteínas ocorre em três fases: iniciação, alongamento e término. Nos procariotos, o mRNA, o formilmetionil-$tRNA_f$ (o tRNA iniciador especial que reconhece AUG) e uma subunidade ribossômica 30S unem-se com o auxílio de fatores de iniciação, formando o complexo de iniciação 30S. Em seguida, uma subunidade ribossômica 50S junta-se a esse complexo para formar um complexo de iniciação 70S, no qual o f-Met-$tRNA_f$ ocupa o sítio P do ribossomo.

O fator de alongamento Tu leva o aminoacil-tRNA apropriado ao sítio A (aminoacil) do ribossomo, na forma de um complexo ternário EF-Tu-aminoacil-tRNA-GTP. O EF-Tu serve tanto para proteger o aminoacil-tRNA da clivagem prematura quanto para aumentar a fidelidade da síntese de proteínas, assegurando a ocorrência do pareamento anticódon-códon correto antes da hidrólise do GTP e a liberação do aminoacil tRNA no sítio A. Forma-se uma ligação peptídica quando o grupo amino do aminoacil-tRNA ataca de modo nucleofílico a ligação éster do peptidil tRNA. Na formação da ligação peptídica, os tRNA e os mRNA devem ser translocados para o início do novo ciclo. O tRNA desacilado move-se para o sítio E e, em seguida, deixa o ribossomo, enquanto o peptidil-tRNA se move do sítio A para o sítio P. O fator de alongamento G utiliza a energia livre da hidrólise do GTP para acionar a translocação. A síntese de proteínas é terminada por fatores de liberação, que reconhecem os códons de terminação UAA, UGA e UAG e causam a hidrólise da ligação éster entre o polipeptídio e o tRNA.

30.4 A síntese de proteínas pelos eucariotos difere da síntese procariótica basicamente no início da tradução

O plano básico da síntese de proteínas nos eucariotos assemelha-se ao dos procariotos; entretanto, existem algumas diferenças significativas entre eles. Os ribossomos eucarióticos (80S) são constituídos de uma pequena subunidade de 40S e de uma subunidade grande 60S. O aminoácido iniciador é novamente a metionina, porém ela não é formilada. A iniciação da síntese de proteínas é mais complexa nos eucariotos do que nos procariotos. Nos eucariotos, o AUG mais próximo da extremidade 5′ do mRNA quase sempre é o sítio de iniciação. O ribossomo 40S encontra esse sítio ligando-se ao *cap* 5′ e, em seguida, procedendo à varredura do RNA até alcançar o AUG. A regulação da tradução nos eucariotos fornece um meio para regular a expressão gênica.

30.5 Vários antibióticos e toxinas podem inibir a síntese de proteínas

Muitos antibióticos clinicamente importantes atuam por meio da inibição da síntese de proteínas. Todas as etapas da síntese de proteínas são suscetíveis à inibição por um antibiótico ou outro. A toxina diftérica inibe a síntese de proteínas ao modificar de modo covalente um fator de alongamento, impedindo, assim, o alongamento. A ricina, uma toxina da mamona, inibe o alongamento ao remover um resíduo de adenina crucial do rRNA.

30.6 Os ribossomos ligados ao retículo endoplasmático fabricam proteínas secretoras e de membrana

As proteínas contêm sinais que determinam o seu destino final. A síntese de todas as proteínas começa em ribossomos livres no citoplasma. Nos eucariotos, a síntese de proteínas continua no citoplasma, a não ser que a cadeia nascente contenha uma sequência sinal que direcione o ribossomo para o retículo endoplasmático. As sequências sinais aminoterminais são constituídas de um segmento hidrofóbico de 9 a 12 resíduos, precedidos de um aminoácido de carga positiva. A partícula de reconhecimento de sinal, uma montagem de ribonucleoproteína, reconhece as sequências sinal e leva os ribossomos que as exibem até o RE. Um ciclo de GTP–GDP libera a sequência sinal da SRP e, em seguida, separa a SRP de seu receptor. Em seguida, a cadeia nascente é translocada através da membrana do RE. As proteínas são transportadas pela célula em vesículas de transporte.

Palavras-chave

aminoacil-tRNA sintetase (p. 894)
anticódon (p. 895)
centro de peptidil transferase (p. 909)
códon (p. 895)
fator de alongamento G (EF-G) (translocase) (p. 910)
fator de alongamento Ts (p. 909)
fator de alongamento Tu (p. 908)
fator de iniciação (p. 908)
fator de liberação (RF) (p. 912)
hipótese da oscilação (p. 898)
partícula de reconhecimento de sinal (SRP) (p. 918)
peptidase sinal (p. 918)
polissomo (p. 912)
proteínas de revestimento (p. 920)
receptor de SRP (p. 918)
ribossomo (p. 893)
RNA transportador (tRNA) (p. 895)
sequência de Shine-Dalgarno (p. 907)
sequência sinal (p. 918)
subunidade 30S (p. 903)
subunidade 50S (p. 903)
tradução (p. 893)
translocon (p. 919)
t-SNARE (p. 920)
vesícula de transporte (p. 919)
v-SNARE (p. 920)

Questões

1. *Peixe babel*. Por que a síntese de proteínas é também denominada tradução?

2. *Cuidadosa, mas nem tanto*. Por que é de fundamental importância que a síntese de proteínas tenha uma frequência de erros de 10^{-4}?

3. *Compartilhamento*. Quais são as características em comum de todas as moléculas de tRNA?

4. *As duas etapas*. Quais são as duas etapas de reações necessárias para a reação de um aminoacil-tRNA?

5. *Iguais, porém diferentes*. Por que as moléculas de tRNA precisam ter tanto características estruturais singulares quanto características estruturais em comum?

6. *Carga*. No contexto da síntese de proteínas, o que significa um aminoácido ativado?

7. *Mecanismo de sintetase*. A formação de isoleucil-tRNA prossegue por meio da formação reversível de um intermediário Ile-AMP ligado à enzima. Preveja se ocorre formação de ATP marcado com ^{32}P a partir de $^{32}PP_i$, quando cada um dos seguintes conjuntos de componentes é incubado com a enzima ativadora específica:

(a) ATP e $^{32}PP_i$

(b) tRNA, ATP e $^{32}PP_i$

(c) Isoleucina, ATP e $^{32}PP_i$

8. *1 = 2, para valores suficientemente grandes de 1*. O equivalente energético a duas moléculas de ATP é utilizado para ativar um aminoácido; contudo, apenas uma molécula de ATP é usada. Explique.

9. *Crivos*. Utilizando a treonil-tRNA sintetase como exemplo, explique a especificidade da formação da treonil-tRNA.

10. *Utilize toda a informação disponível*. Sugira um motivo pelo qual existem duas classes de aminoacil-tRNA sintetases, em que cada classe reconhece uma face diferente do tRNA.

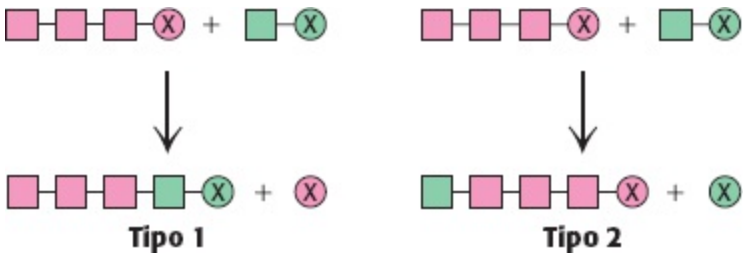
11. *Oscilando*. Explique como é possível que algumas moléculas de tRNA reconheçam mais de um códon.

12. *Ribossomos leves e pesados*. Foram isolados ribossomos de bactérias cultivadas em meio "pesado" (^{13}C e ^{15}N) e de bactérias cultivadas em meio "leve" (^{12}C e ^{14}N). Esses ribossomos 60S foram adicionados a um sistema *in vitro* envolvido na síntese de proteínas. Uma alíquota removida várias horas depois foi analisada por centrifugação de gradiente de densidade. Quantas bandas de ribossomos 70S você espera encontrar no gradiente de densidade?

13. *O preço da síntese de proteínas*. Qual é o menor número de moléculas de ATP e de GTP consumidas na síntese de uma proteína de 200 aminoácidos, começando pelos aminoácidos? Suponha que a hidrólise de PP_i seja equivalente à hidrólise de ATP para esse cálculo.

14. *Modos contrastantes de alongamento*. Os dois mecanismos básicos para o alongamento de biomoléculas são representados na ilustração a seguir. No tipo 1, o grupo ativador (X) é liberado da cadeia em crescimento. No tipo 2, o grupo ativador é liberado da unidade que chega, à medida que é adicionado à cadeia em crescimento. Indique se cada uma das biossínteses a seguir ocorre por meio

do mecanismo tipo 1 ou tipo 2:



(a) Síntese de glicogênio

(b) síntese de ácidos graxos

(c) $C_5 \rightarrow C_{10} \rightarrow C_{15}$ na síntese de colesterol

(d) Síntese de DNA

(e) Síntese de RNA

(f) Síntese de proteínas

15. *Fase correta*. O que significa *fase de leitura?*

16. *Fase de leitura supressora*. A inserção de uma base em uma sequência codificante leva a uma mudança na fase de leitura, o que, na maioria dos casos, produz uma proteína não funcional. Proponha uma mutação em que um tRNA poderia suprimir a fase de leitura.

17. *Marcando um sítio ribossômico*. Planeje um reagente de marcação por afinidade para um dos sítios de ligação de tRNA nos ribossomos de *E. coli*.

18. *Mutação viral*. Um transcrito de mRNA de um gene do fago T7 contém a sequência de bases.

↓

5′–AACUGCACGAGGUAACACAAGAUGGCU–3′

Preveja o efeito de uma mutação que modifique a G marcada por uma seta em A.

19. *Uma nova tradução*. Um RNA transportador com um anticódon UGU é conjugado enzimaticamente com cisteína marcada com ^{14}C. Em seguida, a cisteína é modificada quimicamente em alanina. O aminoacil-tRNA alterado é adicionado a um sistema de síntese de proteínas contendo componentes normais, à exceção desse tRNA. O mRNA adicionado a essa mistura contém a seguinte sequência:

5′–UUUUGCCAUGUUUGUGCU–3′

Qual é a sequência do peptídio correspondente radiomarcado?

20. *Dois modos de síntese*. Compare e contraste a síntese de proteínas por ribossomos pela síntese de proteínas pelo método de fase sólida (ver Seção 3.5).

21. *Intensificando a fidelidade*. Compare a acurácia da replicação do DNA, da síntese de RNA e da síntese de proteínas. Quais são os mecanismos utilizados para assegurar a fidelidade de cada um desses processos?

22. *Hidrólise do GTP deflagrada*. Os ribossomos aceleram acentuadamente a hidrólise do GTP

ligado ao complexo de EF-Tu e aminoacil-tRNA. Qual o significado biológico dessa potencialização da atividade de GTPase pelos ribossomos?

23. *Bloqueando a tradução*. Planeje uma estratégia experimental para desligar a expressão de um RNA específico sem modificar o gene que codifica a proteína ou os elementos de controle do gene.

24. *Problema de sentido*. Suponha que você tenha um sistema de síntese de proteínas que esteja produzindo uma proteína denominada A. Além disso, você sabe que a proteína A tem quatro sítios sensíveis à tripsina, igualmente espaçados na proteína que, na digestão com a tripsina, produzem os peptídios A_1, A_2, A_3, A_4 e A_5. O peptídio A_1 é o peptídio aminoterminal, enquanto o peptídio A_5 é o peptídio carboxiterminal. Por fim, você sabe que o seu sistema necessita de 4 min para sintetizar uma proteína completa A. No $t = 0$, você adiciona todos os 20 aminoácidos, cada um deles marcado com ^{14}C.

(a) No $t = 1$ min, você isola a proteína A intacta do sistema, procede à sua clivagem com tripsina e isola os 5 peptídios. Qual o peptídio mais intensamente marcado?

(b) No $t = 3$ min, qual será a ordem de marcação dos peptídios do mais para o menos marcado?

(c) O que esse experimento lhe diz sobre o sentido da síntese de proteínas?

25. *Tradutor*. As aminoacil-tRNA sintetases são os únicos componentes da expressão gênica que descodificam o código genético. Explique.

26. *Dispositivo de cronometragem*. O EF-Tu, um membro da família das proteínas G, desempenha um papel crucial no processo de alongamento da tradução. Suponha que um análogo do GTP lentamente hidrolisável seja acrescentado a um sistema de alongamento. Qual seria o efeito sobre a velocidade de síntese de proteína?

27. *Não apenas RNA*. Quais são as funções dos fatores proteicos necessários para a síntese de proteínas?

28. *Transporte de membrana*. Quais são os quatro componentes necessários para a translocação de proteínas através da membrana do retículo endoplasmático?

29. *Empurre. Não puxe*. Qual é a fonte de energia que aciona o movimento de proteínas cotraducional através do retículo endoplasmático?

30. *É preciso saber onde olhar*. Os RNA mensageiros procarióticos habitualmente contêm muitos códons AUG. Como o ribossomo identifica o AUG que especifica o processo de iniciação?

31. *Fundamentalmente a mesma, contudo...* Liste as diferenças entre a síntese de proteínas nos procariotos e nos eucariotos.

32. *Como um* border collie. Qual é o papel da partícula de reconhecimento de sinal na translocação de proteínas?

33. *Linha de montagem*. Por que a síntese de proteínas que ocorre nos polissomos é vantajosa?

34. *Estabeleça a correspondência*

(a) Iniciação

(b) Alongamento

(c) Término

1. GTP
2. AUG
3. fMet
4. RRF
5. IF2
6. Shine-Dalgarno
7. EF-Tu
8. Peptidil transferase
9. UGA
10. Transformilase

35. *Esforço desperdiçado?* As moléculas de RNA transportador são muito grandes, tendo em vista que o anticódon é constituído de apenas 3 nucleotídios. Qual o propósito do restante da molécula de tRNA?

Questões sobre mecanismo

36. *Ataque molecular*. Qual é o nucleófilo na reação catalisada pela peptidil transferase? Sugira um mecanismo plausível para essa reação.

37. *Escolha evolutiva de aminoácidos*. A ornitina assemelha-se estruturalmente à lisina, exceto que a cadeia lateral da ornitina é mais curta que a da lisina por um grupo metileno. As tentativas de síntese química e isolamento do ornitil-tRNA não foram bem-sucedidas. Proponha uma explicação ao nível de mecanismo. (Dica: os anéis de seis membros são mais estáveis do que os anéis de sete membros).

Questões | Integração de capítulos

38. *Déjá vu*. Que proteína nas cascatas de proteína G desempenha um papel semelhante ao do fator de alongamento Ts?

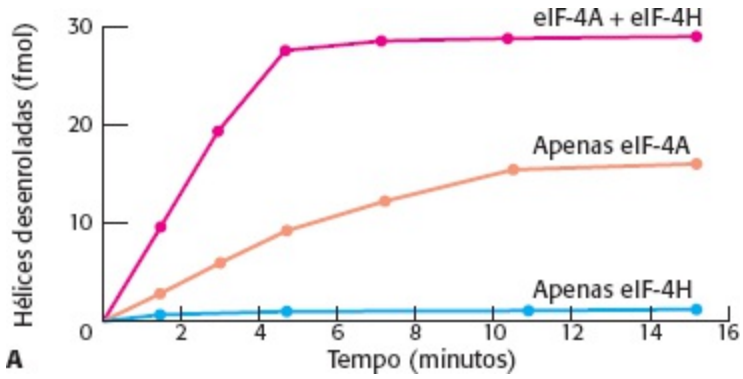
39. *Semelhança familiar*. O fator de alongamento 2 eucariótico é inibido pela ADP ribosilação catalisada pela toxina diftérica. Que outras proteínas G são sensíveis a esse modo de inibição?

40. E. coli *excepcional*. Diferentemente da *E. coli*, a maioria das bactérias não apresenta um complemento total de aminoacil-tRNA sintetase. Por exemplo, *Helicobacter pylori*, causa de úlceras gástricas, tem $tRNA^{Gln}$, mas nenhuma Gln-tRNA sintetase. Entretanto, a glutamina é um aminoácido comum nas proteínas de *H. pylori*. Sugira um meio pelo qual a glutamina possa ser incorporada em proteínas do *H. pylori*. (Dica: a Glu-tRNA sintetase pode acilar incorretamente o $tRNA^{Gln}$).

41. *Etapa final*. Que aspecto da estrutura primária possibilita a transferência da informação de ácidos nucleicos lineares na estrutura tridimensional funcional das proteínas.

Questões | Interpretação de dados

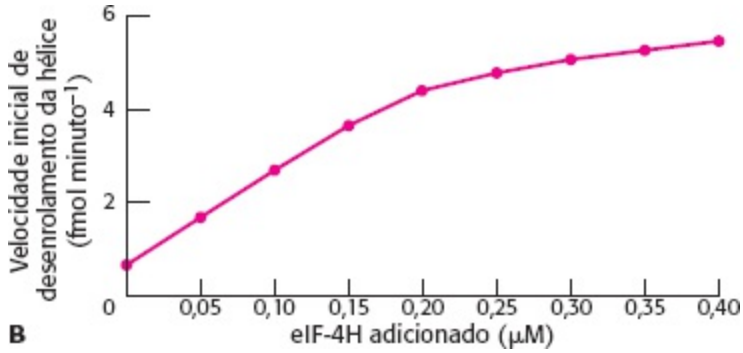
42. *Helicase auxiliar*. O fator de iniciação eIF-4 exibe atividade de RNA helicase dependente de ATP. Foi proposto outro fator de iniciação, o eIF-4H, para auxiliar a ação do eIF-4. O gráfico A mostra alguns dos resultados experimentais de um ensaio que pode medir a atividade da eIF-4 helicase na presença de eIF-4H.



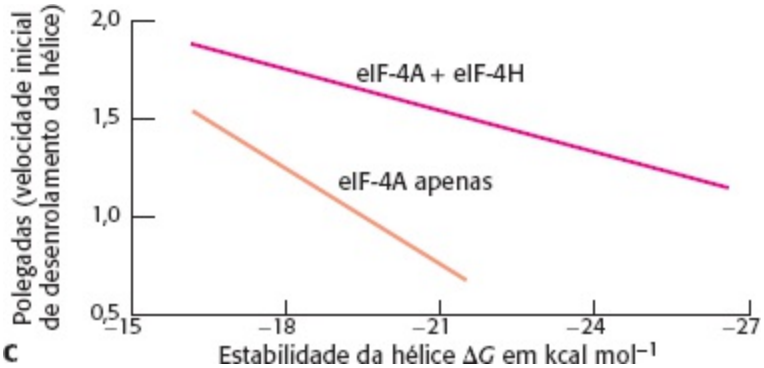
(a) Quais são os efeitos sobre a atividade da IF-4 helicase na presença de eIF-4H?

(b) Por que a medição da atividade de helicase do eIF-4H isoladamente serve como um controle importante?

(c) A taxa inicial de atividade de helicase de 0,2 μM do eIF-4 foi então medida com quantidades variáveis de eIF-4H (gráfico B). Que razão entre eIF-4H e eIF-4 produziu uma atividade ótima?



(d) Em seguida, foi testado o efeito da estabilidade da hélice RNA-RNA sobre a velocidade inicial de desenrolamento na presença e na ausência de eIF-4H (gráfico C). Como o efeito do eIF-4H varia de acordo com a estabilidade da hélice?

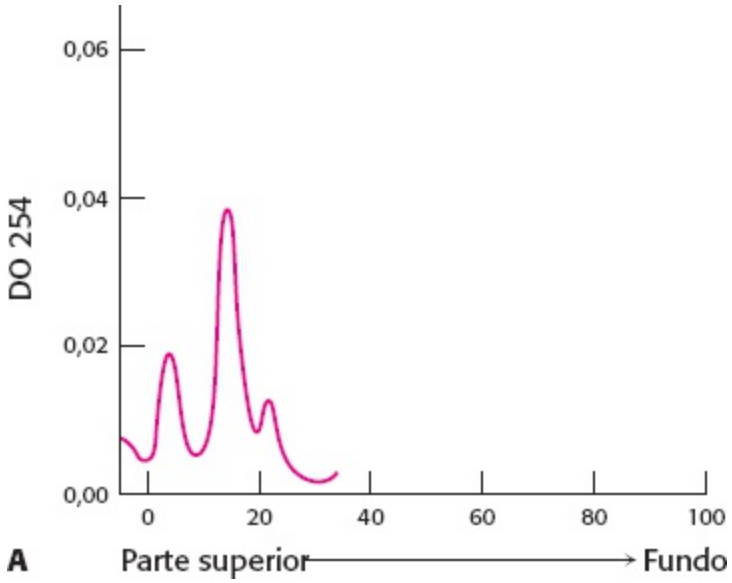


(e) Como o eIF-4H poderia afetar a atividade de helicase do eIF-4A?

[Dados de N. J. Richter, G. W. Rodgers, Jr., J. O. Hensold and W. C. Merrick. Further Biochemical and kinetic characterization of human eukaryotic initiation factor 4H. *J. Biol. Chem.* 274:35415-35424, 1999.]

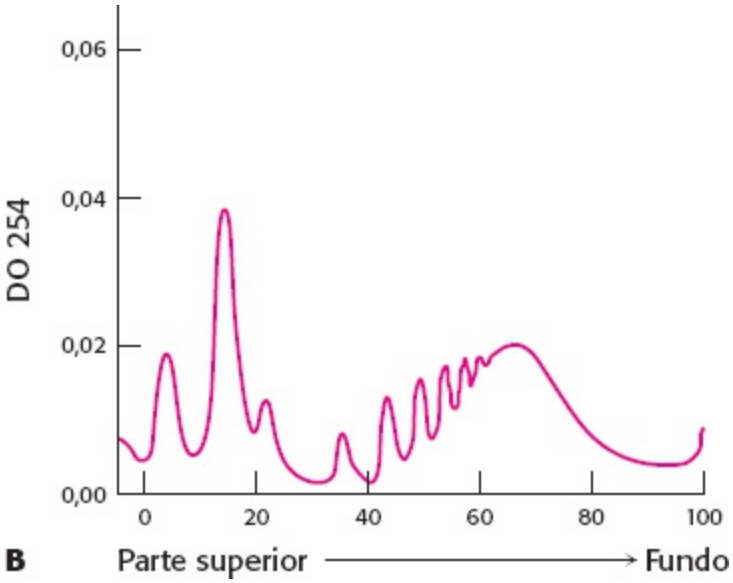
43. *Separação de tamanho*. A maquinaria de síntese de proteínas foi isolada de células eucarióticas e brevemente tratada com uma baixa concentração de RNase. A amostra foi então submetida a centrifugação com gradiente de sacarose. O gradiente foi fracionado, e a absorvância ou densidade óptica (DO) em 254 nm foi registrada para cada fração. Foi obtido o seguinte gráfico.

(a) O que representam os três picos de absorvância no gráfico A?

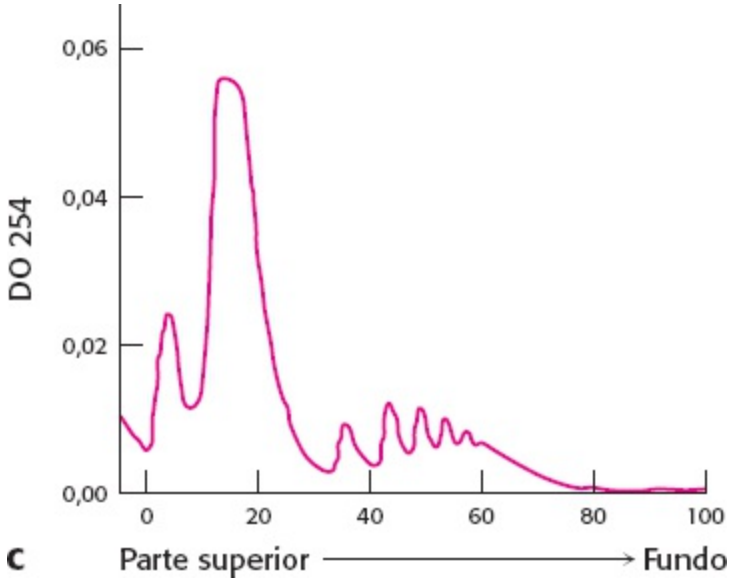


O experimento foi repetido, exceto que, desta vez, foi omitido o tratamento com RNase.

(b) Por que o padrão de centrifugação no gráfico B é mais complexo? O que representam as séries de pico próximo ao fundo do tubo de centrífuga?



Antes do isolamento da maquinaria de síntese de proteínas, as células foram cultivadas em baixas concentrações de oxigênio (condições hipóxicas). Mais uma vez, o experimento foi repetido sem tratamento com RNase (gráfico C).

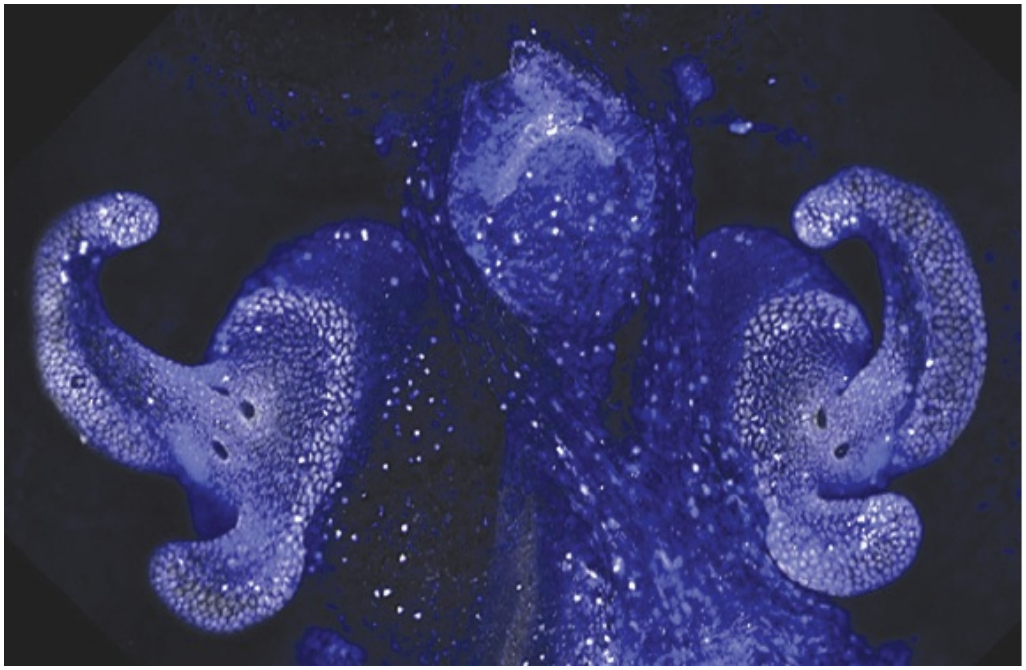


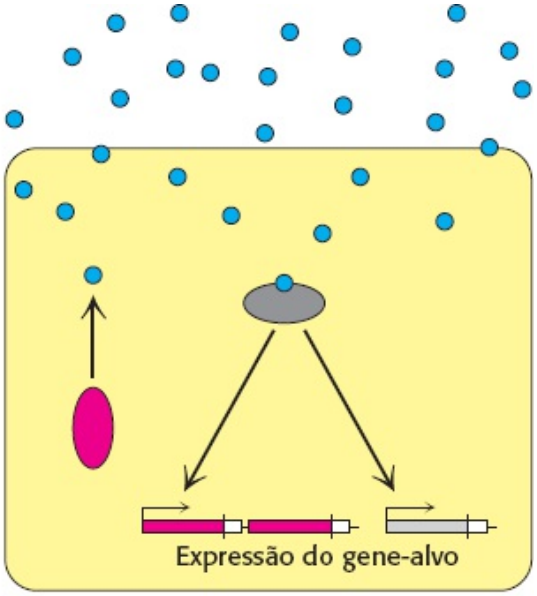
(c) Qual o efeito do crescimento das células em condições hipóxicas?

[Dados de M. Koritzinsky *et al. EMBO J.* 25:1114-1125, 2006.]

Controle da Expressão Gênica nos Procariotos

31





As bactérias respondem a alterações em seus ambientes. Uma micrografia do órgão de luz de uma lula (*Euprymna scolopes*) recém-nascida é mostrada à esquerda. Os pontos luminosos são consequentes a colônias de bactérias *Vibrio fischerili* que vivem em simbiose nos órgãos de luz. Essas bactérias se tornam luminescentes assim que atingem uma densidade apropriadamente elevada. A densidade é detectada pelo circuito mostrado à direita no qual cada bactéria libera uma pequena molécula para o meio ambiente. A molécula é posteriormente captada por outras células bacterianas, que iniciam uma cadeia de sinalização que estimula a expressão de genes específicos. [S. V. Nyholm *et al. PNAS* 97(2000): 10231-10235. Copyright 2000 National Academy of Science.]

SUMÁRIO

31.1 Muitas proteínas que se ligam ao DNA reconhecem sequências específicas do DNA

31.2 As proteínas procarióticas que se ligam ao DNA conectam-se especificamente a sítios reguladores em *óperons*

31.3 Circuitos reguladores podem resultar em permuta entre os padrões de expressão gênica

31.4 A expressão gênica pode ser controlada em nível pós-transcricional

Até mesmo células procarióticas simples precisam responder às alterações no seu metabolismo ou no seu meio ambiente. Boa parte dessa resposta consiste em alterações na expressão gênica. Um gene é *expresso* quando é transcrito em RNA e, para a maioria dos genes, é traduzido em proteínas. Alguns desses genes são expressos o tempo todo. Esses genes estão sujeitos à *expressão constitutiva*. Muitos outros genes são expressos apenas em algumas circunstâncias – ou seja, em um conjunto específico de condições fisiológicas. Esses genes estão sujeitos à *expressão regulada*. Por

exemplo, o nível de expressão de alguns genes nas bactérias pode variar mais de 1.000 vezes em resposta ao aporte de nutrientes ou a desafios ambientais.

Neste capítulo examinaremos os mecanismos de regulação gênica nos procariotos, sobretudo em *E. coli*, porque muitos desses processos foram descobertos nesse organismo. No Capítulo 32, apresentaremos os mecanismos de regulação gênica nos eucariotos. Mostraremos tanto as semelhanças substanciais como as diferenças fundamentais na comparação dos mecanismos de regulação gênica nesses dois tipos de organismos.

Como a expressão gênica é controlada? *A atividade gênica é controlada, primeiramente, e mais importante, no nível da transcrição*. A transcrição de um gene é determinada pela inter-relação de sequências específicas de DNA e determinadas proteínas que se ligam a essas sequências. Com maior frequência essas proteínas reprimem a expressão de genes específicos por meio de bloqueio ao acesso da RNA polimerase a seus promotores. Em alguns casos, entretanto, as proteínas conseguem ativar a expressão de genes específicos. Aprenderemos sobre as diferentes estratégias que permitem a regulação coordenada de conjuntos de genes. Alguns genes também são controlados em outros estágios além do nível de transcrição e descreveremos alguns mecanismos nesses estágios. Por fim, examinaremos alguns exemplos importantes da regulação da expressão gênica em resposta a modificações nas concentrações de moléculas específicas no ambiente das células procarióticas.

31.1 Muitas proteínas que se ligam ao DNA reconhecem sequências específicas do DNA

Como os sistemas reguladores diferenciam os genes que precisam ser ativados ou reprimidos dos genes que são constitutivos? Afinal de contas, as próprias sequências de DNA dos genes não apresentam características diferenciadoras que permitiriam que os sistemas reguladores as reconhecessem. Na verdade, a regulação gênica depende de outras sequências no genoma. Nos procariotos, esses sítios reguladores estão próximos à região do DNA que é transcrita. De modo geral, os sítios reguladores são sítios de ligação para proteínas específicas de ligação ao DNA, que podem estimular ou reprimir a expressão gênica. Esses sítios reguladores foram identificados pela primeira vez em *E. coli* durante estudos de alteração da expressão gênica. Na presença do dissacarídio lactose, a bactéria começa a expressar um gene que codifica β-galactosidase, uma enzima que processa lactose para utilização como fonte de carbono e energia. A sequência do sítio regulador desse gene é mostrada na Figura 31.1. A sequência de nucleotídios desse sítio mostra uma repetição invertida quase perfeita, indicando que o DNA nessa região tem um eixo quase duplo de simetria. É preciso lembrar que os sítios de clivagem das enzimas de restrição (p.ex., *Eco*RV) apresentam propriedades de simetria semelhantes (Seção 9.3). A simetria nesses sítios reguladores corresponde, em geral, à simetria na proteína que se liga a esse sítio. *Compatibilidade de simetria é um tema recorrente nas interações entre proteína e DNA.*

Figura 31.1 Sequência do sítio regulador *lac*. A sequência de nucleotídios desse sítio regulador mostra uma repetição invertida quase perfeita, correspondendo à simetria rotacional dupla no DNA. As partes das sequências que estão relacionadas por esta simetria são mostradas na mesma cor.

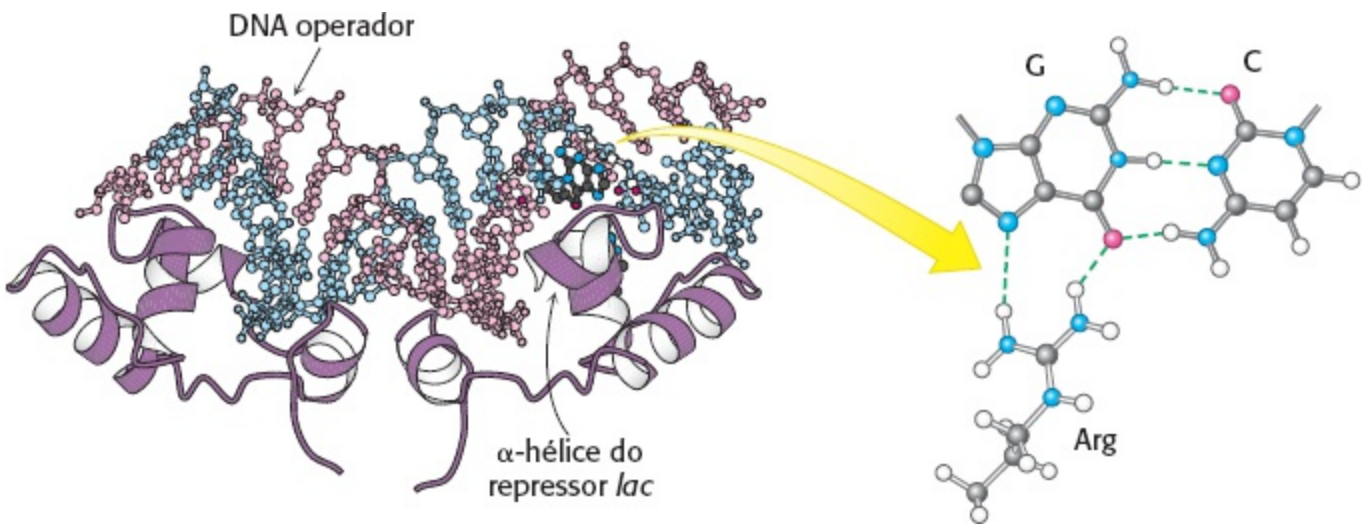


Figura 31.2 O complexo repressor *lac*-DNA. O domínio de ligação ao DNA de uma proteína reguladora de gene, o repressor lac, conecta-se a um fragmento α de DNA contendo seu sítio de ligação preferido (descrito como DNA operador) por meio da inserção de uma α-hélice no sulco principal do DNA operador. *Observe* que um contato específico se forma entre um resíduo de arginina do repressor e um par de bases G-C no sítio de ligação. [Desenhada a partir de 1EFA.pdb.]

Para compreender as minúcias dessas interações entre proteína e DNA os cientistas examinaram a estrutura do complexo entre um oligonucleotídio que inclui esse sítio e a unidade de ligação ao DNA que o reconhece (Figura 31.2). A unidade de ligação ao DNA provém de uma proteína denominada *repressor lac*, que coíbe a expressão do gene processador da lactose. Como esperado, essa unidade de ligação ao DNA se conecta como um dímero, e o eixo duplo de simetria do dímero combina com a simetria do DNA. Uma α-hélice de cada monômero da proteína se insere no sulco principal do DNA, enquanto as cadeias laterais de aminoácidos fazem contatos específicos com as bordas expostas dos pares de bases. Por exemplo, a cadeia lateral de um resíduo de arginina da proteína forma um par de pontes de hidrogênio com um resíduo de guanina do DNA e isso não seria possível com nenhuma outra base. Essa interação e outras semelhantes permitem que o repressor *lac* se acople de forma mais firme a este sítio do que a uma ampla gama de outros sítios no genoma da *E. coli*.

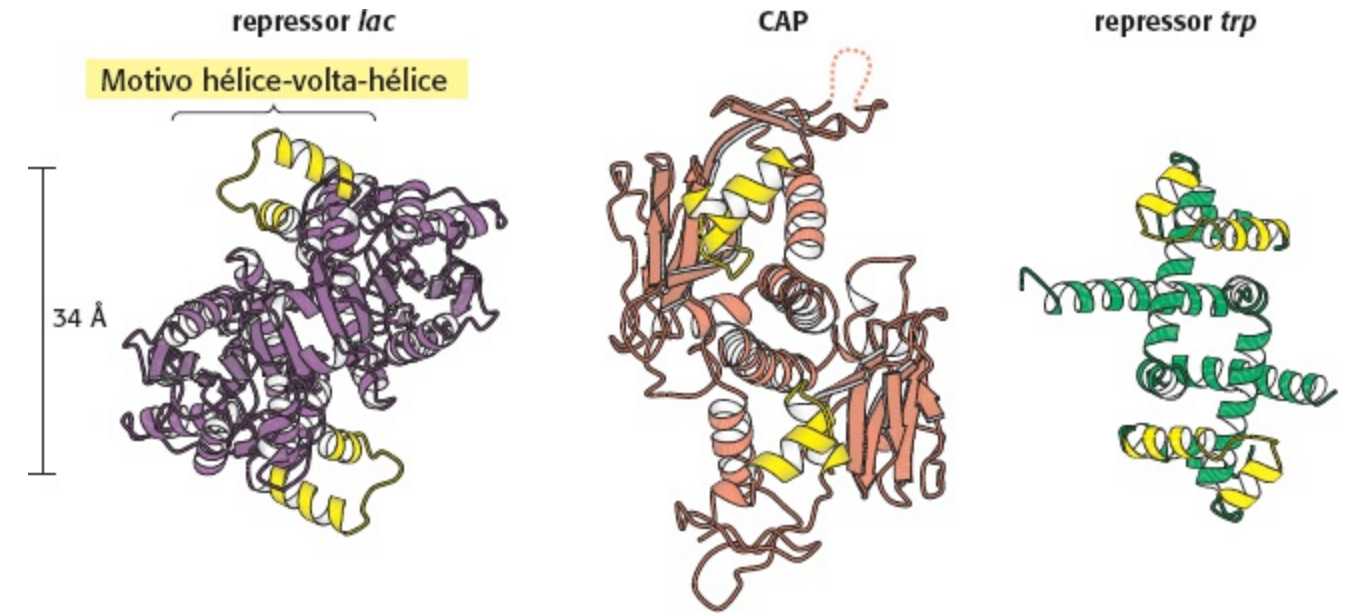


Figura 31.3 Motivo hélice-volta-hélice. Essas estruturas mostram três proteínas de ligação ao DNA sequência-específicas que interagem com o DNA por meio de um motivo hélice-volta-hélice (realçado em amarelo). Observe que, em cada caso, as unidades hélice-volta-hélice em um dímero de proteína estão separadas por aproximadamente 34 Å, correspondendo a uma volta completa do DNA. [Desenhada a partir de 1EFA, 1 RUN, e 1TRO.pdb.]

O motivo hélice-volta-hélice é comum a muitas proteínas que ligam DNA em procariotos

Estratégias semelhantes são empregadas por outras proteínas que ligam DNA em procariotos? Atualmente as estruturas de muitas dessas proteínas já foram determinadas e são conhecidas as sequências de aminoácidos de muitas outras. É digno de nota que as superfícies de ligação ao DNA de muitas dessas proteínas consistem em um par de α-hélices separadas por uma volta apertada (Figura 31.3). Em complexos com DNA, a segunda dessas duas hélices (frequentemente denominada *hélice de reconhecimento*) situa-se no sulco principal, onde as cadeias laterais de aminoácidos estão em contato com as bordas dos pares de bases. Em contrapartida, os resíduos da primeira hélice participam basicamente dos contatos com o arcabouço do DNA. Motivos hélice-volta-hélice são encontrados em muitas proteínas que se acoplam ao DNA na forma de dímeros e, assim, duas das unidades serão encontradas, uma em cada monômero.

Embora o motivo hélice-volta-hélice seja o mais observado na unidade de ligação ao DNA em procariotos, nem todas as proteínas reguladoras se acoplam ao DNA por meio desse tipo de unidade. Um exemplo notável é representado pelo repressor da metionina da *E. coli* (Figura 31.4). Essa proteína se liga ao DNA por meio da inserção de um par de folhas β no sulco principal.

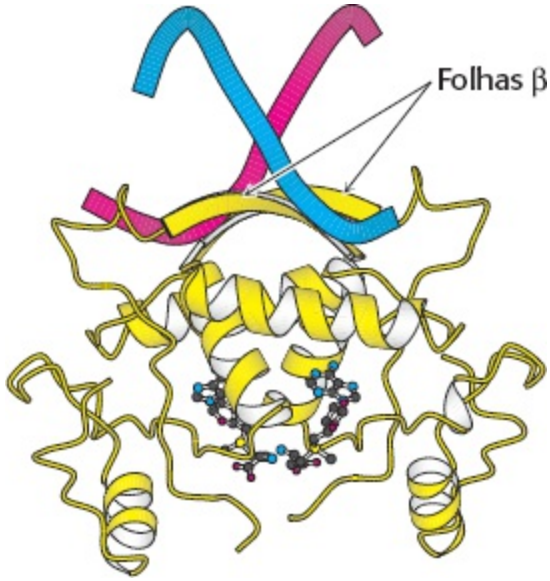


Figura 31.4 Reconhecimento do DNA por meio de folhas β. Um repressor da metionina é mostrado conectado ao DNA. *Observe* que resíduos nas folhas β, e não nas α-hélices, participam das interações cruciais entre a proteína e o DNA. [Desenhada a partir de 1CMA.pdb.]

31.2 As proteínas procarióticas que se ligam ao DNA conectam-se especificamente a sítios reguladores em *óperons*

Um exemplo historicamente importante revela muitos princípios em comum da regulação gênica por proteínas que se ligam ao DNA. Bactérias como *E. coli* dependem, geralmente, da glicose como fonte de carbono e energia, mesmo quando existem outros carboidratos disponíveis. Quando a glicose é escassa, *E. coli* consegue usar a lactose como fonte de carbono, embora esse dissacarídio não participe em nenhuma via metabólica importante. Uma enzima essencial no metabolismo da lactose é a β-*galactosidase*, que hidrolisa lactose a galactose e glicose. Esses produtos são, então, metabolizados pelas vias discutidas no Capítulo 16.

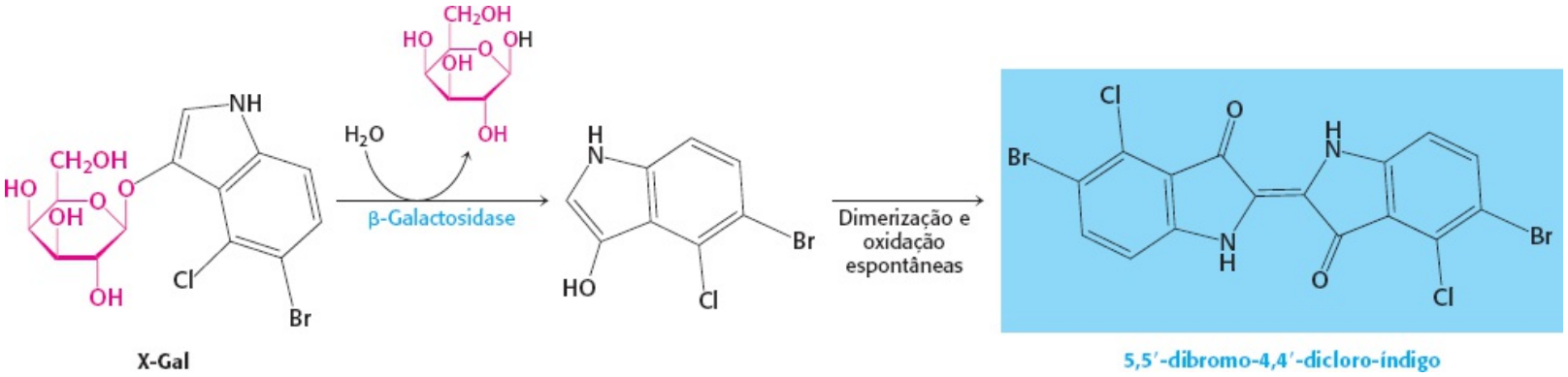
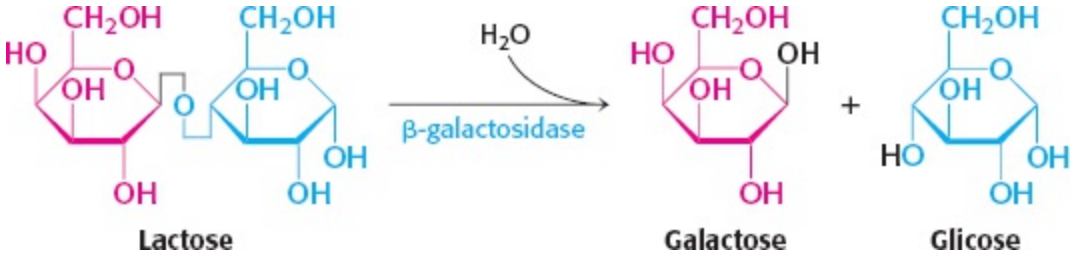


Figura 31.5 Monitoramento da reação da β-galactosidase. O substrato galactosídeo, X-Gal, origina um produto colorido por ocasião da clivagem pela β-galactosidase. O aparecimento desse produto colorido é um método conveniente de monitorar a quantidade de enzima (tanto *in vitro* como *in vivo*).



Essa reação pode ser acompanhada no laboratório graças ao uso de substratos galactosídeos que formam produtos coloridos como o X-Gal (Figura 31.5). *E. coli* crescendo em uma fonte de carbono como glicose ou glicerol contém menos de 10 moléculas de β-galactosidase. Em contrapartida, a mesma célula conterá alguns milhares de moléculas da enzima quando cultivada em lactose (Figura 31.6). A presença de lactose no meio de cultura induz um grande aumento da quantidade de β-galactosidase estimulando a síntese de novas moléculas da enzima em vez da ativação de um precursor inativo preexistente.

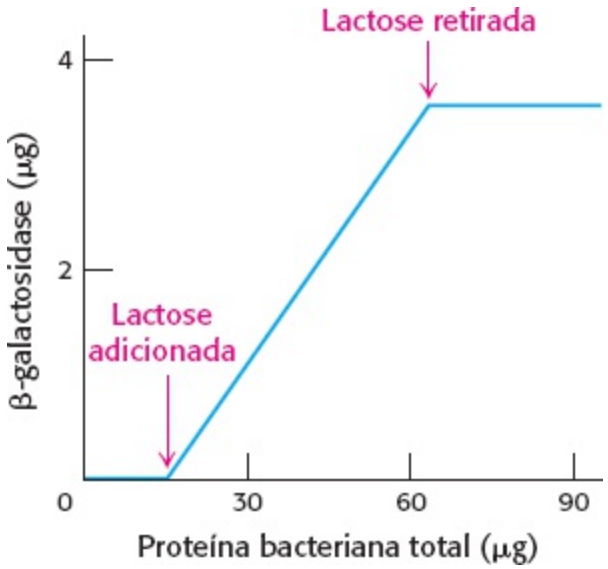


Figura 31.6 Indução da β-galactosidase. O acréscimo de lactose a uma cultura de *E. coli* faz com que a produção de β-galactosidase aumente de níveis muito baixos até níveis muito elevados. O aumento dos níveis da enzima acompanha o aumento do número de células na cultura. A β-galactosidase constitui 6,6% da proteína total sintetizada na presença de lactose.

Um indício essencial do mecanismo de regulação gênica foi a observação de que duas outras

proteínas são sintetizadas ao mesmo tempo que a β-galactosidase, a saber, a *galactosídeo permease* e a *tiogalactosídeo transacetilase*. A permease é necessária para o transporte da lactose através da membrana celular bacteriana (Seção 13.3). A enzima transacetilase não é essencial ao metabolismo da lactose, mas aparentemente participa na detoxificação de compostos que também são transportados pela permeasse. Assim sendo, *os níveis de expressão de um conjunto de enzimas que contribuem para a adaptação de uma determinada modificação ambiental também são alterados*. Essa unidade coordenada de expressão gênica é denominada *óperon*.

Um óperon consiste em elementos reguladores e genes codificadores de proteína

A regulação paralela da β-galactosidase, da permease e da transacetilase sugeria que a expressão dos genes que codificam essas enzimas fosse controlada por um mecanismo compartilhado. François Jacob e Jacques Monod propuseram que o *modelo óperon* é responsável por essa regulação paralela, e por resultados de outros experimentos genéticos. Os elementos genéticos do modelo consistem em um *gene regulador* que codifica uma proteína reguladora, uma sequência reguladora de DNA (denominada *sítio operador*) e um conjunto de *genes estruturais* (Figura 31.7).

O gene regulador codifica uma *proteína repressora* que se liga ao operador. A conexão do repressor com o operador evita a transcrição dos genes estruturais. O operador e seus genes estruturais associados constituem o *óperon*. Para o *óperon da lactose (lac)*, o gene *i* codifica o repressor, *o* é o sítio operador e os genes *z*, *y* e *a* são os genes estruturais para a β-galactosidase, a permease e a transacetilase, respectivamente. O *óperon* também contém um sítio promotor (denominado *p*), que direciona a RNA polimerase para o sítio correto de iniciação da transcrição. Os genes *z*, *y* e *a* são transcritos para formar uma molécula única de mRNA que codifica as três proteínas. Uma molécula de mRNA que codifica mais de uma proteína é conhecida como transcrito *poligênico* ou *policistrônico*.

Figura 31.7 Óperons. **A**. A estrutura geral de um *óperon* segundo a concepção de Jacob e Monod. **B**. A estrutura do *óperon* da lactose. Além do promotor, *p*, no *óperon*, existe um segundo promotor na frente do gene regulador, *i*, para impulsionar a síntese do regulador.

Quando não há lactose, a proteína repressor *lac* liga-se ao operador e bloqueia a transcrição

Quando não há lactose, o *óperon* da lactose é reprimido. Como o repressor *lac* medeia essa coibição? O *repressor lac* existe na forma de um tetrâmero de subunidades de 37 kDa com dois pares de subunidades que se reúnem para formar a unidade de ligação ao DNA discutida anteriormente. Na ausência da lactose, o repressor se liga muito firme e rapidamente ao operador. Quando o repressor *lac* está ligado ao DNA, o repressor não permite que a RNA polimerase transcreva os genes codificadores de proteínas contanto que o sítio do operador esteja diretamente adjacente e posterior ao sítio promotor onde o repressor bloquearia o avanço da RNA polimerase.

Como o repressor *lac* localiza o sítio operador no cromossomo de *E. coli*? O repressor *lac* conecta-se 4×10^6 vezes mais fortemente ao DNA operador do que a sítios aleatórios no genoma.

Esse elevado grau de seletividade possibilita que o repressor encontre o operador eficientemente, mesmo quando existe um grande excesso ($4{,}6 \times 10^6$) de outros sítios no genoma de *E. coli*. A constante de dissociação para o complexo repressor-operador é de aproximadamente 0,1 pM (10^{-13} M). A constante de velocidade para associação ($\approx 10^{10}$ $M^{-1}s^{-1}$) é excepcionalmente elevada, indicando que o repressor encontre o operador basicamente por difusão ao longo de uma molécula de DNA (uma busca unidimensional) em vez de encontrá-lo a partir do meio aquoso (uma busca tridimensional). Essa difusão foi confirmada por estudos que monitoraram o comportamento de moléculas únicas de repressor *lac* marcadas com fluorescência no interior de células vivas de *E. coli*.

A inspeção da sequência completa do genoma de *E. coli* revela dois sítios a 500 pb do sítio operador primário próximo à sequência do operador. Quando uma unidade dimérica de ligação ao DNA se acopla ao sítio operador, a outra unidade de ligação ao DNA do tetrâmero repressor *lac* consegue se conectar com um desses sítios com sequências semelhantes. O DNA entre os dois sítios ligados forma uma alça. Não há outros sítios com compatibilidade com a sequência do sítio *operador lac* no restante da sequência genômica de *E. coli*. Por conseguinte, *a especificidade de ligação ao DNA do repressor* lac *é suficiente para discriminar um sítio quase singular no genoma de* E. coli.

A estrutura tridimensional do repressor *lac* foi determinada de várias maneiras. Cada monômero consiste em um domínio aminoterminal pequeno que se liga ao DNA e um domínio maior que medeia a formação de uma unidade dimérica de ligação ao DNA com o tetrâmero (Figura 31.8). Um par de domínios aminoterminais se reúne para formar a unidade funcional de ligação ao DNA. Cada monômero contém uma unidade hélice-volta-hélice que interage com o sulco principal do DNA ligado.

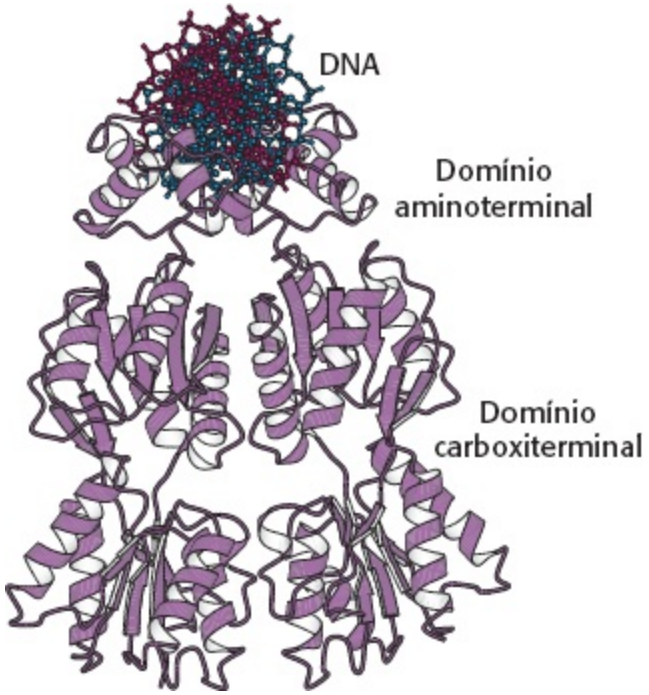


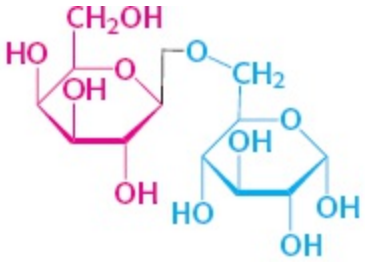
Figura 31.8 Estrutura do repressor *lac*. Um dímero do repressor *lac* ligado ao DNA é mostrado. *Observe* que o domínio aminoterminal se conecta ao DNA, enquanto o domínio carboxiterminal forma uma estrutura separada. Uma parte da estrutura que medeia a formação dos tetrâmeros do repressor *lac* não é mostrada. [Desenhada a partir de 1EFA.pdb.]

A conexão com ligante consegue induzir alterações estruturais nas proteínas reguladoras

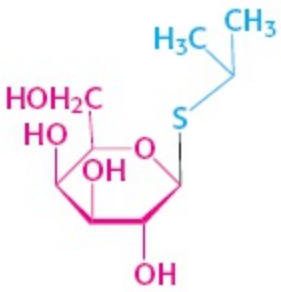
Na situação que acabamos de descrever existe glicose (mas não há lactose), e o *óperon lac* está reprimido. Como a presença de lactose deflagra o alívio dessa repressão e, desta forma, a expressão do *óperon lac*? É interessante mencionar que a lactose em si não exerce esse efeito, mas a *alolactose*, uma combinação de galactose com a glicose com uma ligação α-1,6 em vez de α-1,4. Assim sendo, a alolactose é denominada *indutor* do *óperon lac*. A alolactose é um subproduto da reação da β-galactosidase, sendo produzida em níveis baixos pelas poucas moléculas de β-galactosidase que existem antes da indução. Alguns outros β-galactosídeos, como *isopropiltiogalactosídeo* (IPTG), são indutores potentes da expressão da β-galactosidase, embora não sejam substratos da enzima. O IPTG é valioso no laboratório como ferramenta para indução de expressão gênica em estirpes bacterianas recombinantes.

O indutor deflagra a expressão gênica ao coibir a ligação do repressor *lac* com o operador. *O indutor liga-se ao repressor lac e, assim, reduz significativamente a afinidade do repressor pelo DNA operador*. Uma molécula indutora se liga ao centro do domínio maior em cada monômero. Essa ligação promove alterações conformacionais que modificam a relação entre os dois pequenos domínios de ligação ao DNA (Figura 31.9). Esses domínios não conseguem mais se conectar de forma simultânea e fácil com o DNA, reduzindo substancialmente a afinidade com o DNA.

Recapitulemos os processos que regulam a expressão gênica no *óperon* da lactose (Figura 31.10). Quando não existe indutor, o repressor *lac* se liga ao DNA de uma maneira que bloqueia a RNA polimerase e não permite a transcrição dos genes *z, y* e *a*. Assim, há produção de pouca β-galactosidase, permeasse ou transacetilase. O acréscimo de lactose ao ambiente resulta na formação de alolactose. Esse indutor se liga ao repressor *lac*, promovendo modificações conformacionais e liberação de DNA pelo repressor *lac*. Com o sítio operador desocupado, a RNA polimerase consegue, então, transcrever os outros genes *lac* e a bactéria produz as proteínas necessárias para o uso eficiente de lactose.



1,6-alolactose



Isopropilgalactosídeo
(IPTG)

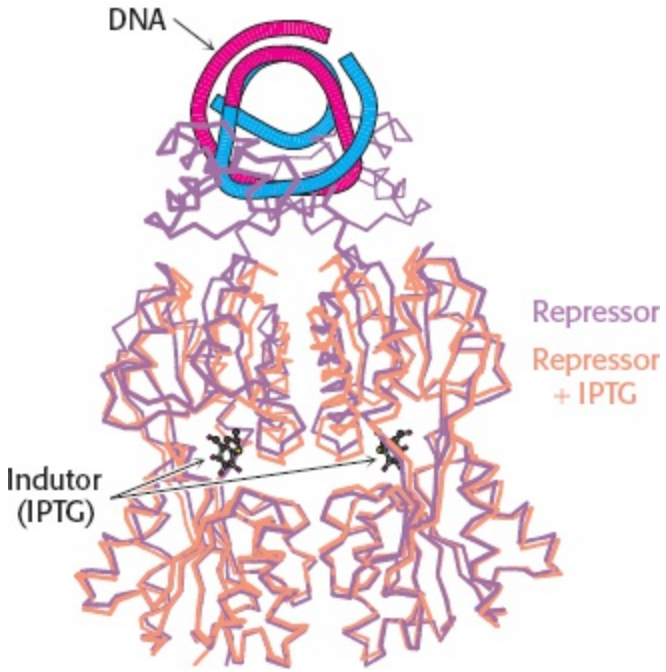


Figura 31.9 Efeitos do IPTG na estrutura do repressor *lac*. A estrutura do repressor *lac* ligado ao indutor isopropiltiogalactosídeo (IPTG), mostrado em cor laranja, é superposta à estrutura do repressor *lac* ligado ao DNA (em roxo). Observe que a ligação de IPTG induz alterações estruturais que modificam a correlação entre os dois domínios de ligação ao DNA de modo que eles não conseguem interagir efetivamente com o DNA. Os domínios de ligação ao DNA do repressor *lac* acoplado a IPTG não são mostrados porque essas regiões não estão bem ordenadas nos cristais estudados.

A estrutura do grande domínio do repressor *lac* é semelhante às estruturas de uma grande classe de proteínas encontradas na *E. coli* e em outras bactérias. Esta família de proteínas homólogas acopla ligantes como açúcares e aminoácidos em seus centros. Vale mencionar que domínios desta família são utilizados por eucariotos em proteínas associadas ao paladar (gustantes) e nos receptores de neurotransmissores, como será mostrado no Capítulo 33.

O óperon é uma unidade reguladora comum nos procariotos

Muitas outras redes reguladoras de genes atuam de modo análogo ao *óperon lac*. Por exemplo, genes que participam na biossíntese de purinas e, em menor grau, das pirimidinas são coibidos pelo *repressor pur*. Essa proteína dimérica tem sequência 31% semelhante à do repressor *lac*, além de uma estrutura tridimensional semelhante. Todavia, o comportamento do repressor *pur* é oposto ao do repressor *lac*: *enquanto o repressor* lac *é liberado* do DNA por meio de ligação a uma pequena molécula, o *repressor* pur *se liga especificamente ao DNA, bloqueando a transcrição, apenas quando está ligado a uma pequena molécula*. Esta pequena molécula é denominada *correpressor*. No caso do repressor *pur*, o correpressor pode ser guanina ou hipoxantina. O repressor *pur* dimérico acopla-se a sítios de repetição invertida do DNA da forma 5′-AN**GCAA**N**CG**N**TT**N**C**N**T**-3′, na qual as bases em negrito são especialmente importantes. O exame da sequência genômica de *E. coli* revela a existência de mais de 20 desses sítios, regulando 19 *óperons* e incluindo mais de 25 genes (Figura 31.11).

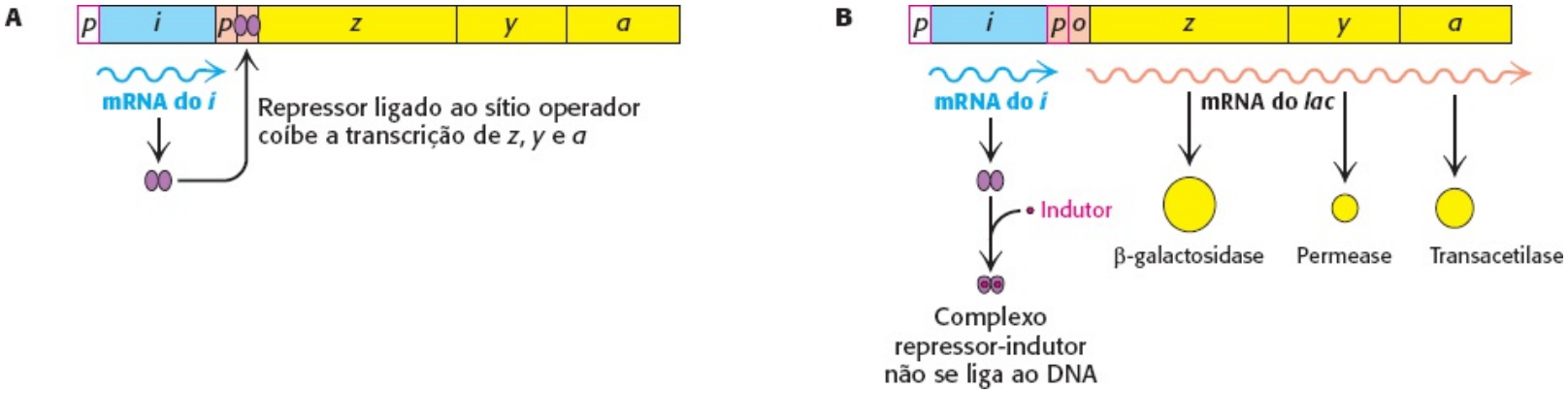


Figura 31.10 Indução do *óperon lac*. **A**. Na ausência de lactose, o repressor *lac* se liga ao DNA e reprime a transcrição a partir do *óperon lac*. **B**. A alolactose ou outro indutor se liga ao repressor *lac*, resultando em sua dissociação do DNA e na produção de mRNA *lac*.

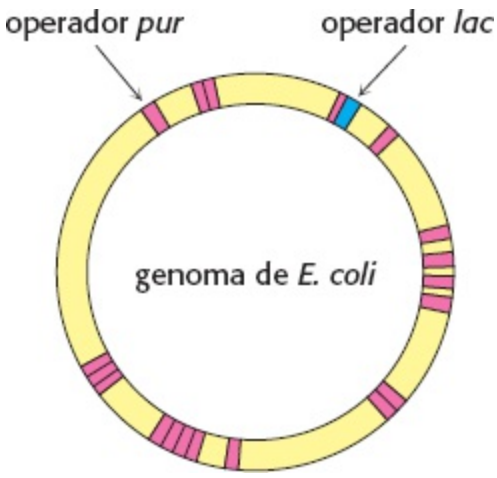


Figura 31.11 Distribuição dos sítios de ligação. O genoma de *E. coli* contém apenas uma região que se combina com a sequência do operador *lac* (mostrado em azul). Em contrapartida, 20 sítios se combinam com a sequência do operador *pur* (mostrado em vermelho). Assim, o repressor *pur* regula a expressão de um número bem maior de genes do que o repressor *lac*.

Como os sítios de ligação ao DNA dessas proteínas reguladoras são curtos, é provável que tenham evoluído independentemente e não sejam relacionados por divergência de um sítio regulador ancestral. Quando aparece uma proteína de ligação ao DNA regulada por ligante em uma célula, sítios de ligação à proteína surgem por mutação adjacente a genes adicionais. Os sítios de

ligação para o repressor *pur* evoluíram nas regiões reguladoras de uma ampla gama de genes que participam na biossíntese de nucleotídios. Todos esses genes podem ser regulados de modo combinado.

A organização dos genes procarióticos em *óperons* é valiosa para a análise de sequências genômicas completas. Algumas vezes, constata-se que um gene cuja função não é conhecida faz parte de um *óperon* contendo genes bem caracterizados. Essas associações podem fornecer indícios importantes das funções bioquímicas e fisiológicas do gene ainda não caracterizado.

A transcrição pode ser estimulada por proteínas que fazem contato com a RNA polimerase

Todas as proteínas que se ligam ao DNA apresentadas até agora inibem a transcrição até que alguma condição ambiental seja atendida, como a presença de lactose. Também existem proteínas que se ligam ao DNA que estimulam a transcrição. Um exemplo muito bem estudado é uma proteína de *E. coli* que estimula a expressão de enzimas catabólicas.

E. coli cultivada em glicose, uma fonte energética preferida, apresenta níveis muito baixos de enzimas catabólicas para a metabolização de outros carboidratos. Obviamente seria um desperdício a síntese dessas enzimas quando a glicose é abundante. A glicose exerce um efeito inibidor sobre os genes que codificam essas enzimas, um efeito denominado *repressão de catabólitos*. Isso se deve ao fato de que a glicose reduz a concentração de AMP cíclico na *E. coli*. Quando a concentração de cAMP está elevada, o cAMP estimula a transcrição associada de muitas enzimas catabólicas por meio da *proteína ativadora de catabólitos* (CAP, do inglês *catabolite activator protein*), que também é conhecida como proteína receptora de cAMP (CRP do inglês, *cAMP receptor protein*).

Quando a CAP está acoplada ao cAMP, estimula a transcrição de genes catabolizadores de lactose e arabinose. CAP é uma proteína de ligação ao DNA sequência-específica. No *óperon lac*, a CAP se liga a uma repetição invertida que está localizada próximo a posição –61 em relação ao sítio de iniciação da transcrição (Figura 31.12). Este sítio está a cerca de 70 pares de bases (pb) do sítio operador. Tendo em vista a simetria do sítio de ligação, a CAP funciona como um dímero de subunidades idênticas.

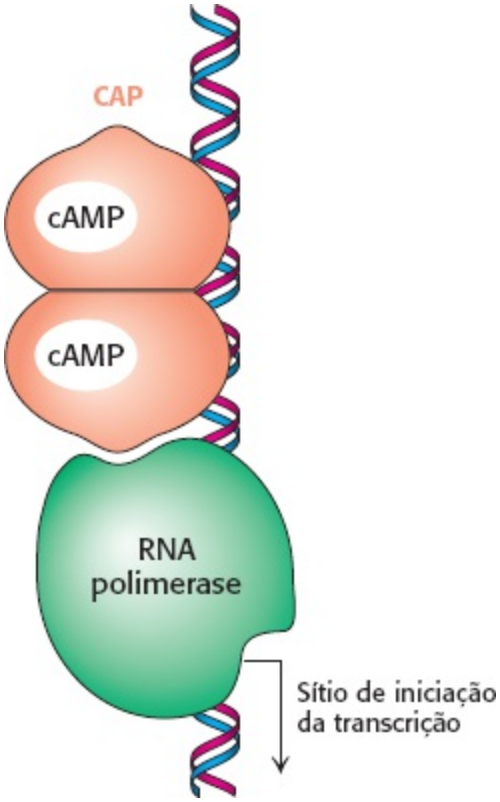


Figura 31.12 Sítio de ligação para a proteína ativadora de catabólitos (CAP). Esta proteína se liga na forma de dímero a uma repetição invertida na posição –61 em relação ao sítio de iniciação da transcrição. O sítio de ligação a CAP no DNA é adjacente à posição na qual a RNA polimerase se liga.

O complexo CAP-cAMP estimula o início da transcrição em um fator de aproximadamente 50. Contatos energeticamente favoráveis entre a CAP e a RNA polimerase aumentam a probabilidade de que a transcrição seja iniciada em sítios aos quais o complexo CAP-cAMP está ligado (Figura 31.13). Portanto, no tocante ao *óperon lac*, a expressão gênica é máxima quando a ligação de alolactose alivia a inibição pelo repressor *lac* e o complexo CAP-cAMP estimula a ligação da RNA polimerase.

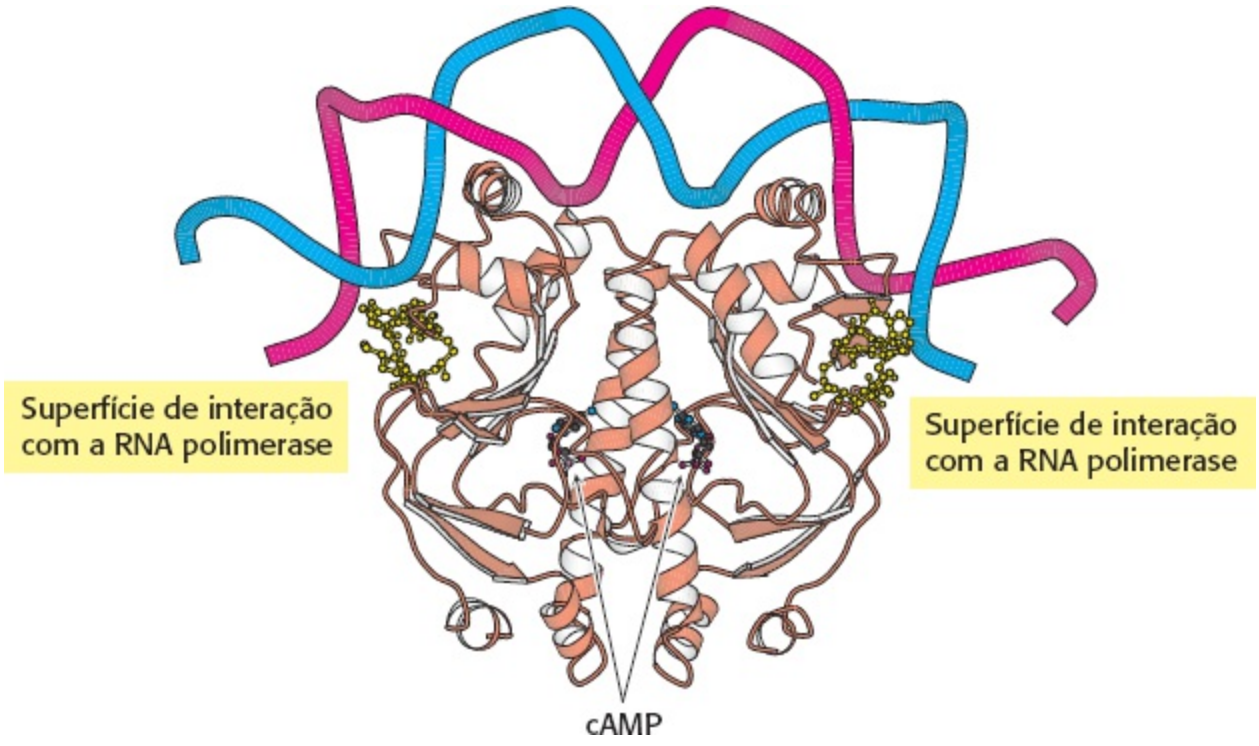


Figura 31.13 Estrutura de um dímero de CAP ligado ao DNA. Os resíduos mostrados em amarelo em cada monômero de CAP já foram implicados em interações diretas com a RNA polimerase. [Desenhada a partir de 1RUN.pdb.]

O genoma de *E. coli* contém muitos sítios de ligação a CAP em posições apropriadas para interações com a RNA polimerase. Assim sendo, o aumento do nível de cAMP em uma bactéria *E. coli* resulta na formação de complexos CAP-cAMP que se acoplam a muitos promotores e estimulam a transcrição de genes que codificam várias enzimas catabólicas.

31.3 Circuitos reguladores podem resultar em permuta entre os padrões de expressão gênica

O estudo dos vírus que infectam bactérias enriqueceu muito a nossa compreensão do processo que controla a expressão gênica. Mais uma vez, as proteínas que se ligam ao DNA sequência-específicas têm participações cruciais nesses processos. As pesquisas do bacteriófago foram especialmente esclarecedoras. Os modos alternativos de infecção do fago foram analisados no Capítulo 5. Na via lítica a maioria dos genes do genoma viral é transcrita, iniciando a produção de muitas partículas virais e resultando na eventual lise da célula bacteriana com a liberação concomitante de aproximadamente 100 partículas virais. Na via lisogênica, o genoma viral é incorporado ao DNA bacteriano no qual a maioria dos genes virais permanece e não é expressada, permitindo que o genoma viral seja carreado enquanto as bactérias se replicam. Duas proteínas fundamentais e um conjunto de sequências reguladoras no genoma viral funcionam como um comutador que determina qual dessas duas vias será seguida.

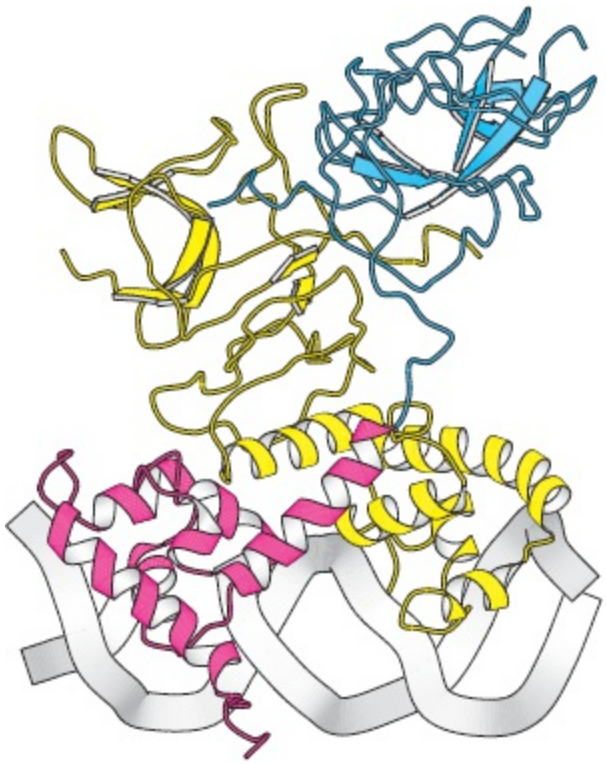


Figura 31.14 Estrutura do repressor λ ligado ao DNA. O repressor λ liga-se ao DNA na forma de um dímero. O domínio aminoterminal de uma subunidade é mostrado em vermelho e o domínio carboxiterminal é mostrado em azul. Na outra subunidade, os dois domínios são mostrados em amarelo. *Observe* como as α-hélices nos domínios aminoterminais se encaixam no sulco principal do DNA. [Desenhada a partir de 3DBN.pdb.]

O repressor lambda regula sua própria expressão

A primeira proteína a ser considerada é o repressor λ, algumas vezes denominado proteína cI λ. Essa proteína é crucial porque bloqueia, direta ou indiretamente, a transcrição de quase todos os genes codificados pelo vírus. A única exceção é o gene que codifica o próprio repressor λ. O repressor consiste em um domínio aminoterminal que se liga ao DNA e um domínio carboxiterminal que participa da oligomerização da proteína (Figura 31.14). Essa proteína se acopla a vários sítios fundamentais no genoma do fago λ. Os sítios mais interessantes para a discussão atual estão no chamado operador direito (Figura 31.15). Essa região inclui três sítios de ligação para o dímero repressor λ, assim como dois promotores em uma região de aproximadamente 80 pares de bases. Um promotor impulsiona a expressão do gene para o próprio repressor λ, enquanto o outro impulsiona a expressão de vários outros genes virais. O repressor não apresenta a mesma afinidade para os três sítios, ligando-se ao sítio O_R1 com a maior afinidade. Além disso, a ligação aos sítios adjacentes é cooperativa, de modo que depois que um dímero do repressor se liga ao O_R1, a probabilidade de uma proteína se ligar ao sítio O_R2 adjacente aumenta em aproximadamente 25 vezes. Portanto, quando existem concentrações moderadas do repressor na célula, a configuração mais provável tem o repressor ligado a O_R1 e O_R2, mas não a O_R3. Nessa configuração o dímero do repressor ligado ao sítio O_R1 bloqueia o acesso ao promotor do lado direito dos sítios operadores, reprimindo a transcrição do gene adjacente que codifica a proteína Cro (*c*ontrolador de *r*epressor e *o*utros), enquanto o dímero do repressor em O_R2 entra em contato com a RNA polimerase e estimula a transcrição do gene que codifica o próprio repressor λ. Desta maneira, o repressor estimula a própria produção. À medida que aumenta a produção do repressor λ, um dímero adicional do repressor consegue se ligar ao sítio O_R3, bloqueando o outro promotor e coibindo a produção adicional de repressor. O operador direito, portanto, mantém o repressor dentro de uma faixa estreita e estável de concentração (Figura 31.16). O repressor também bloqueia outros promotores no genoma do fago de modo que o repressor é a única proteína do fago produzida, que corresponde ao estado lisogênico.

Figura 31.15 Sequência do operador direito. Três sítios operadores (O_R1, O_R2 e O_R3) estão coloridos em amarelo e o centro deles está assinalado. Os sítios de iniciação do mRNA do repressor e do mRNA de Cro são mostrados, assim como suas sequências –10 e –35.

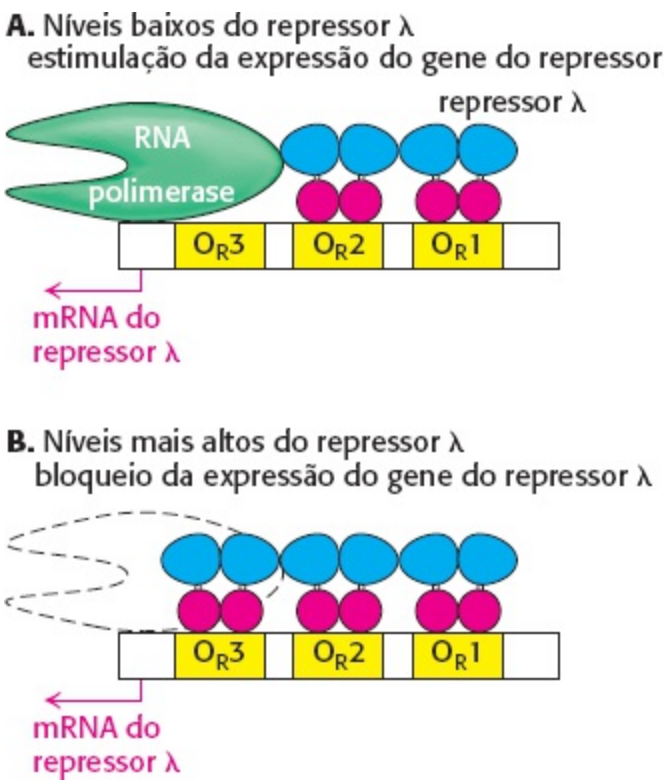


Figura 31.16 O repressor λ controla sua própria síntese. Quando os níveis de repressor λ estão relativamente baixos, o repressor se acopla aos sítios O_R1 e O_R2 e estimula a transcrição do gene que codifica o próprio repressor λ. Quando os níveis de repressor λ estão mais elevados, o repressor também se liga ao sítio O_R3, bloqueando o acesso ao seu promotor e reprimindo a transcrição desse gene.

Um circuito baseado em repressor lambda e Cro forma uma permuta genética

O que estimula a troca para a via lítica? Alterações como o dano do DNA desencadeiam a clivagem do repressor em uma ligação específica entre os domínios de oligomerização e ligação com o DNA. Esse processo é mediado pela proteína RecA da *E. coli* (Seção 28.5). Após essa clivagem, a afinidade do repressor pelo DNA diminui. Assim que o repressor se desconecta do sítio O_R1, o gene Cro pode ser transcrito. Cro é uma pequena proteína que se liga aos mesmos sítios do repressor λ, mas apresenta uma ordem de afinidade diferente pelos três sítios no operador direito. Particularmente Cro apresenta maior afinidade por O_R3. Cro ligado a esse sítio bloqueia a produção de repressor novo. A ausência de repressor resulta na produção de outros genes do fago, com a consequente produção de partículas virais e, por fim, lise das células hospedeiras. Assim sendo, esse circuito genético age como um comutador com dois estados estáveis: (1) nível alto de repressor e nível baixo de Cro correspondem ao estado lisogênico e (2) nível alto de Cro e nível baixo de repressor correspondem ao estado lítico (Figura 31.17). Circuitos reguladores com diferentes proteínas que se ligam ao DNA controlando a expressão dos genes de cada um constituem um motivo comum de controle da expressão gênica.

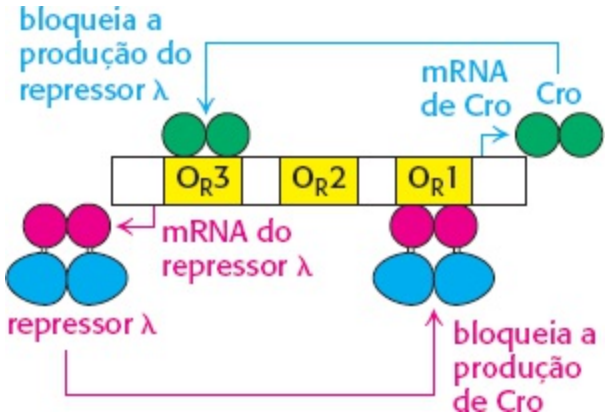


Figura 31.17 O repressor e a Cro formam um circuito genético. O repressor λ bloqueia a produção de Cro ao se ligar mais favoravelmente ao sítio O_R1, enquanto Cro bloqueia a produção do repressor ao se ligar com maior afinidade ao sítio O_R3. Esse circuito forma um comutador que determina se a via lisogênica ou a via lítica será seguida.

Muitas células procarióticas liberam sinais químicos que regulam a expressão gênica em outras células

Tradicionalmente as células procarióticas são consideradas células únicas solitárias. Todavia, é cada vez mais evidente que, em muitas circunstâncias, as células procarióticas vivem em comunidades complexas, interagindo com outras células da mesma espécie e de espécies diferentes. *Essas interações sociais modificam os padrões de expressão gênica nas células*.

Um tipo importante de interação é denominado *quorum sensing*. Esse fenômeno foi descoberto na bactéria *Vibrio fischeri*, uma espécie de bactéria que consegue viver em um órgão de luz especializado na lula da ordem Sepiolida. Nessa relação simbiótica as bactérias produzem luciferase e fluorescem, protegendo assim a lula (evitam que a lula seja iluminada por trás pelo luar) em troca de um local protegido para viver e reproduzir. Quando essas bactérias crescem em cultura em baixa densidade, elas não fluorescem. Todavia, quando a densidade celular atinge um nível crítico, o gene da luciferase é expresso e as células fluorescem. Uma observação importante foi que, ao transferir as células de *V. fischeri* para um meio estéril no qual já existiam outras células de *V. fischeri* em alta densidade, essas células se tornavam fluorescentes mesmo quando a densidade era baixa. Esse experimento revelou que uma substância química, que posteriormente se descobriu ser uma lactona N-3-oxo-hexanoil homosserina (a partir de agora denominada AHL, acil-homosserina lactona), era liberada para o meio e desencadeava a fluorescência (Figura 31.18). Esse e outros compostos que desempenham papéis semelhantes são denominados *autoindutores*.

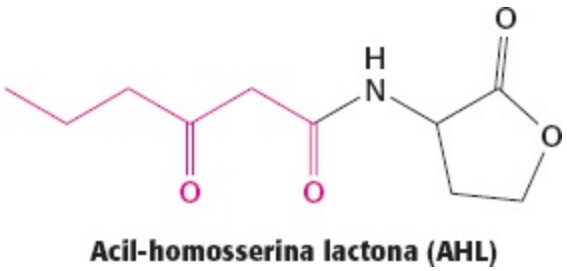


Figura 31.18 Estrutura do autoindutor. A estrutura da acil-homosserina lactona *N*-3-oxo-hexanoil homosserina lactona, o autoindutor de *V. fischeri*. Os autoindutores de outras espécies bacterianas podem apresentar grupos acila diferentes (mostrados em vermelho).

As células de *V. fischeri* liberam o autoindutor para seu ambiente e outros *V. fischeri* captam a

substância química. As células de *V. fischeri* expressam uma proteína de ligação ao DNA LuxR que serve como receptor para o autoindutor. LuxR é constituída por dois domínios, um deles se liga a AHL e o outro se acopla ao DNA por um motivo hélice-volta-hélice (Figura 31.19). Após a concentração intracelular de AHL se elevar até o nível adequado, uma fração substancial das moléculas de LuxR se liga a AHL. Os dímeros de LuxR, após a ligação com AHL, acoplam-se a sítios específicos no DNA e aumentam a velocidade da iniciação da transcrição de genes específicos. Entre esses genes-alvo está um *óperon* que inclui LuxA e LuxB, que juntas codificam a enzima luciferase, e LuxI, que produz uma enzima que catalisa a formação de mais AHL.

Visto que cada célula produz apenas uma pequena quantidade do autoindutor, este sistema regulador permite que cada célula de *V. fischeri* determine a densidade da população de *V. fischeri* em seu ambiente – daí a denominação *quorum sensing* desse processo. Os estudos de outras células procarióticas estão revelando uma elaborada linguagem química de diferentes autoindutores (assim como de autorrepressores que coíbem genes específicos). As "palavras" nesta linguagem incluem outras moléculas lactonas acil-homosserina com diferentes funcionalidades e comprimentos de cadeia acila, assim como outras classes distintas de moléculas.

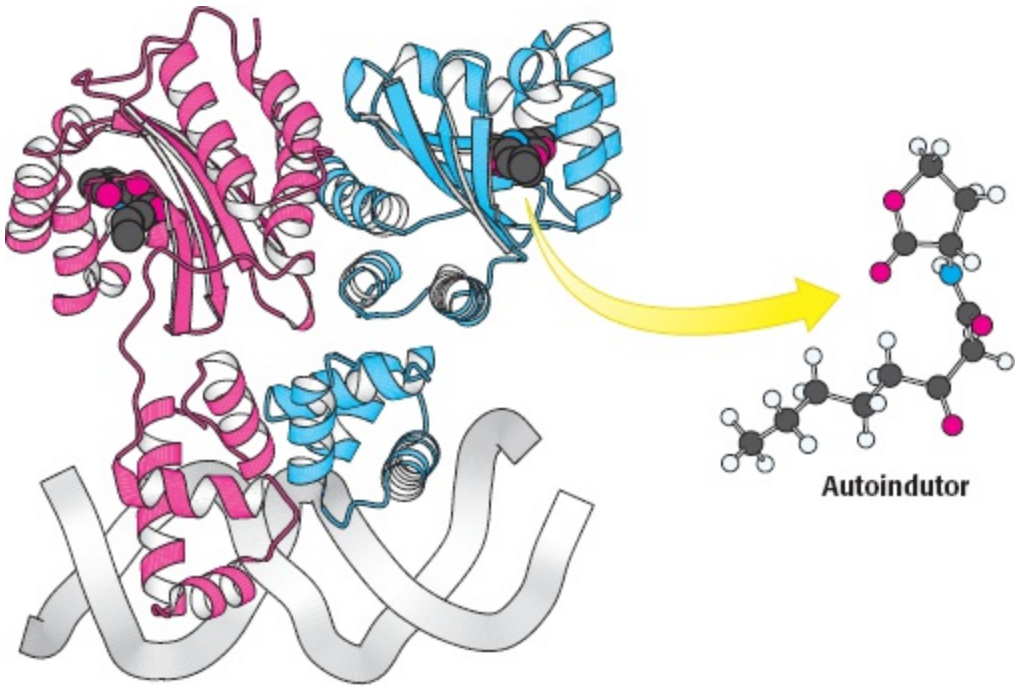


Figura 31.19 Regulador gênico de *quorum sensing*. A estrutura de um homólogo de LuxR (TraR da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*) é mostrada. *Observe* que a proteína dimérica se liga ao DNA por meio de um domínio α-helicoidal, enquanto o autoindutor se liga a um domínio separado.

Biofilmes são comunidades complexas de procariotos

Muitas espécies de procariotos podem ser encontradas em estruturas especializadas denominadas *biofilmes* que podem se formar nas superfícies. Os biofilmes têm considerável importância médica porque os organismos em seu interior são frequentemente muito resistentes à resposta imune do hospedeiro, assim como aos antibióticos. A interação *quorum sensing* parece ser importante na formação de biofilmes porque as células conseguem detectar outras células em seus ambientes e promovem a formação de comunidades com composições específicas. Alguns genes controlados por mecanismos *quorum sensing* promovem a formação de moléculas específicas que servem como arcabouço para o biofilme. Uma recente e intrigante descoberta é que muitos dos organismos

encontrados nos biofilmes ou em nossos corpos (talvez 95% ou mais) não cresceram em cultura. Por meio de métodos de sequenciamento do DNA, estamos elaborando um censo melhor de nosso microbioma e tentando compreender os mecanismos reguladores de genes que apoiam essas comunidades complexas.

31.4 A expressão gênica pode ser controlada em nível pós-transcricional

A modulação da taxa de iniciação de transcrição é o mecanismo mais comum de regulação gênica. Todavia, outros estágios de transcrição também podem ser alvos de regulação. Além disso, o processo de tradução proporciona outros pontos de intervenção para regulação do nível de produção de proteína por uma célula. No Capítulo 29 apresentamos comutadores ribossômicos (*riboswitches*) que controlam a interrupção da transcrição (Seção 29.1). Outros *riboswitches* controlam a expressão gênica por meio de outros mecanismos como a formação de estruturas que inibem a tradução. Já foram descobertos outros mecanismos de regulação gênica pós-transcrição.

Atenuação é um mecanismo dos procariotos para regular a transcrição por meio da modulação da estrutura secundária do RNA nascente

Um método de regular a transcrição em bactérias foi descoberto por Charles Yanofsky e seus colegas como resultado de seus estudos do *óperon* do triptofano. Esse *óperon* codifica cinco enzimas que convertem corismato em triptofano. A análise da extremidade 5′ do mRNA de trp revelou a existência de uma *sequência líder* de 162 nucleotídios antes do códon de iniciação da primeira enzima. Outra observação notável foi que as bactérias produziam um transcrito composto pelos 130 primeiros nucleotídios quando o nível de triptofano estava elevado, mas produziam um mRNA *trp* de 7.000 nucleotídios, incluindo toda a sequência líder, quando o nível de triptofano estava baixo. Assim, quando os níveis de triptofano estão elevados e não são necessárias enzimas biossintéticas, a transcrição é interrompida antes da produção de mRNA codificador das enzimas. O sítio de interrupção é denominado atenuador, e esse modo de regulação é denominado *atenuação*.

A atenuação depende de características da extremidade 5′ do produto mRNA (Figura 31.20). A primeira parte da sequência líder codifica um peptídio líder com 14 aminoácidos. O atenuador, uma região de RNA que consegue formar várias estruturas alternativas, ocorre após a fase de leitura aberta do peptídio. É preciso lembrar que a transcrição e a tradução estão firmemente acopladas nas bactérias. Portanto, a tradução do mRNA de trp começa logo depois da síntese do sítio de ligação ao ribossomo.

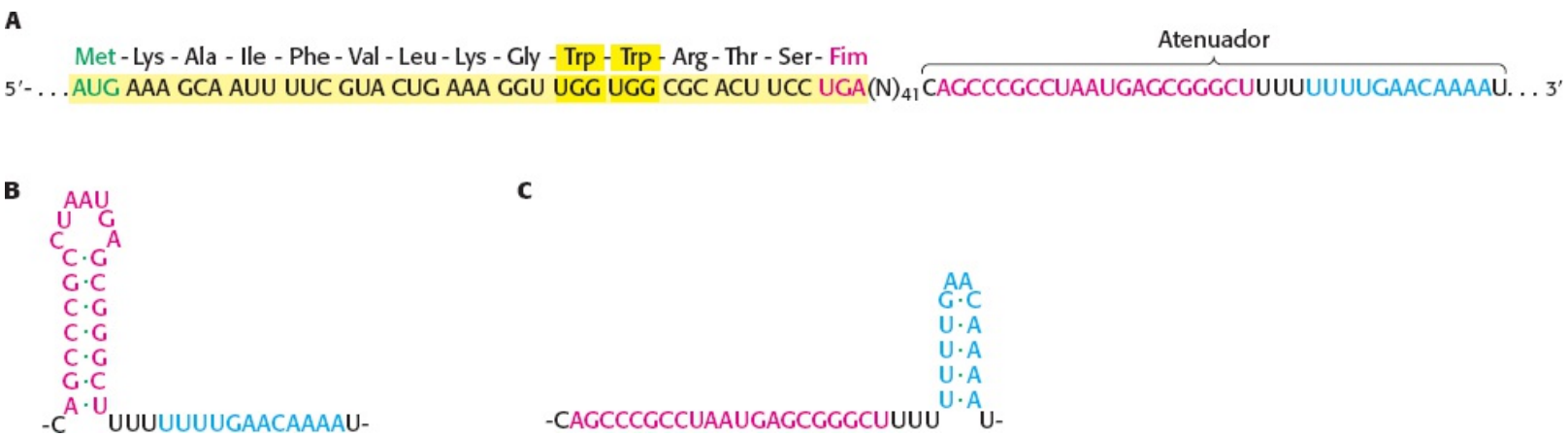


Figura 31.20 A região líder do mRNA trp. A A sequência nucleotídica líder da extremidade 5′ do mRNA trp inclui uma fase de leitura aberta curta que codifica um peptídio composto por 14 aminoácidos. O líder codifica dois resíduos de triptofano e apresenta uma região atenuadora não traduzida (nucleotídios azuis e vermelhos). **B** e **C**. A região atenuadora consegue adotar uma de duas estruturas haste-alça distintas.

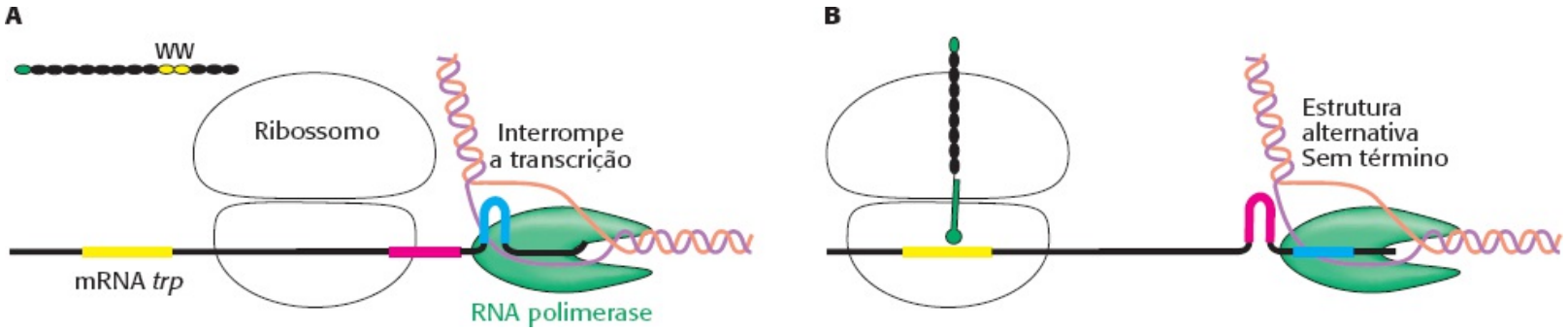


Figura 31.21 Atenuação. A Na presença de concentrações adequadas de triptofano (e, portanto, tRNA-Trp), a tradução prossegue rapidamente e se forma uma estrutura de RNA que interrompe a transcrição. **B**. Quando as concentrações de triptofano estão baixas, a tradução para enquanto aguarda tRNA-Trp, dando tempo para a formação de uma estrutura alternativa de RNA que não interrompa a transcrição de forma eficiente.

Como o nível de triptofano modifica a transcrição do *óperon trp*? Um indício importante foi o achado de que o peptídio líder com 14 aminoácidos inclui dois resíduos de triptofano adjacentes. Um ribossomo consegue traduzir a região líder do produto mRNA apenas na presença de concentrações adequadas de triptofano. Quando existe triptofano suficiente, uma estrutura haste-alça se forma na região atenuadora, que resulta na liberação da RNA polimerase do DNA (Figura 31.21). Todavia, quando não há triptofano suficiente, a transcrição é terminada menos frequentemente. Há pouco triptofanil-tRNA e o ribossomo para nos códons UGG tandem que codificam para o triptofano. Esse retardo deixa a região adjacente do mRNA exposta enquanto a transcrição continua. É formada uma estrutura alternativa do RNA que não atua como terminadora e a transcrição prossegue em direção às regiões codificadoras de enzimas e através delas. Assim sendo, a atenuação constitui um método elegante de detecção do aporte de triptofano necessário para a síntese de proteína.

Vários outros *óperons* para a biossíntese de aminoácidos em *E. coli* também são regulados por sítios atenuadores. O peptídio líder de cada um contém numerosos resíduos de aminoácidos do tipo sintetizado pelo *óperon* (Figura 31.22). Por exemplo, o peptídio líder do *óperon* da fenilalanina inclui 7 resíduos de fenilalanina entre 15 resíduos. O *óperon* da treonina codifica as enzimas necessárias para a síntese de treonina e isoleucina; o peptídio líder contém 8 resíduos de treonina e 4 resíduos de isoleucina em uma sequência de 16 resíduos. O peptídio líder do *óperon* da histidina

inclui 7 resíduos de histidina sucessivos. Em cada caso níveis baixos do tRNA carregado correspondente "interrompem" o ribossomo, retendo o mRNA nascente em um estado que consegue formar uma estrutura que permite que a RNA polimerase "leia" através do sítio atenuador. Aparentemente a evolução convergiu nessa estratégia repetidamente como um mecanismo para controlar a biossíntese de aminoácidos.

Figura 31.22 Sequências do peptídio líder. As sequências de aminoácidos e as sequências de nucleotídios correspondentes do mRNA (**A**) do *óperon* da treonina, (**B**) do *óperon* da fenilalanina e (**C**) do *óperon* da histidina. Em cada caso, a abundância de um aminoácido na sequência do peptídio líder resulta em atenuação.

Resumo

31.1 Muitas proteínas que se ligam ao DNA reconhecem sequências específicas do DNA

A regulação da expressão gênica depende da inter-relação de sequências específicas no genoma e proteínas que se ligam especificamente a esses sítios. Proteínas específicas que se ligam ao DNA reconhecem sítios reguladores que geralmente são adjacentes aos genes cuja transcrição é regulada por essas proteínas. As proteínas da maior família contêm um motivo hélice-volta-hélice. A primeira hélice desse motivo se insere no sulco principal do DNA e apresenta pontes de hidrogênio específicas e outros contatos com as bordas dos pares de bases.

31.2 As proteínas procarióticas que se ligam ao DNA conectam-se especificamente a sítios reguladores em óperons

Nos procariotos, muitos genes estão agrupados em *óperons*, que são unidades de expressão gênica coordenada. Um *óperon* consiste em sítios de controle (um operador e um promotor) e um conjunto de genes estruturais. Além disso, os genes reguladores codificam proteínas que interagem com os sítios operador e promotor para estimular ou inibir a transcrição. O tratamento de *E. coli* com lactose induz aumento da produção de β-galactosidase e duas outras proteínas que são codificadas no *óperon* da lactose. Na ausência de lactose ou um indutor galactosídeo semelhante, o repressor *lac* (proteína) se liga a um sítio operador no DNA e bloqueia a transcrição. A ligação de alolactose, um derivado da lactose, ao repressor *lac* induz uma modificação conformacional que resulta na dissociação do DNA. A RNA polimerase consegue, então, mover-se através do operador para transcrever o óperon *lac*.

Algumas proteínas ativam a transcrição ao entrar em contato direto com a RNA polimerase. O AMP cíclico, por exemplo, estimula a transcrição de muitos *óperons* catabólicos ao se acoplar

à proteína ativadora de catabólitos. A ligação do complexo cAMP-CAP a um sítio específico na região promotora de um *óperon* catabólico induzível incrementa a ligação da RNA polimerase e a iniciação da transcrição.

31.3 Circuitos reguladores podem resultar em permuta entre os padrões de expressão gênica

O estudo dos vírus bacterianos, sobretudo do bacteriófago λ, revelou aspectos cruciais das redes reguladoras de genes. O bacteriófago consegue se desenvolver seja pela via lítica ou lisogênica. Uma proteína reguladora essencial, o repressor λ, regula sua própria expressão, promovendo a transcrição do gene que codifica o repressor quando os níveis do mesmo estão baixos e bloqueando a transcrição quando os níveis estão elevados. Esse comportamento depende do operador direito λ, que inclui três sítios aos quais o dímero do repressor consegue se ligar. A proteína Cro se acopla aos mesmos sítios do repressor λ, mas com afinidades inversas. Quando as concentrações de Cro são suficientes, há bloqueio da transcrição do gene que codifica o repressor e, ao mesmo tempo, estímulo à transcrição do próprio gene. Portanto, essas duas proteínas e o operador formam um comutador genético que pode existir em ambos os estados.

Algumas espécies de procariotos participam do *quorum sensing*. Esse processo inclui a liberação de substâncias químicas denominadas autoindutores para o meio em torno das células. Esses autoindutores são, com frequência, acil-homosserina lactonas. Os autoindutores são captados pelas células circundantes. Quando a concentração de autoindutores atinge um nível apropriado, eles são ligados por proteínas receptoras que ativam a expressão dos genes, inclusive daqueles que promovem a síntese de mais autoindutores. Essas interações sociais quimicamente mediadas permitem que esses procariotos modifiquem seus padrões de expressão gênica em resposta às outras células de seus ambientes. Biofilmes são comunidades complexas de procariotos que são promovidas por mecanismos de *quorum sensing*.

31.4 A expressão gênica pode ser controlada em nível pós-transcricional

A expressão gênica também pode ser regulada no nível da tradução. Nos procariotos muitos *óperons* importantes para a biossíntese de aminoácidos são regulados por atenuação, um processo que depende da formação de estruturas alternativas no mRNA, sendo que uma delas favorece o término da transcrição. A atenuação é mediada pela tradução de uma região líder do mRNA. Um ribossomo "parado" por causa da ausência de aminoacil-tRNA necessário para traduzir o mRNA líder modifica a estrutura do mRNA, permitindo que a RNA polimerase transcreva o *óperon* além do sítio atenuador.

Palavras-chave

atenuação (p. 936)
autoindutor (p. 936)
biofilme (p. 936)
correpressor (p. 933)
β-galactosidase (p. 930)
indutor (p. 932)

isopropiltiogalactosídeo (IPTG) (p. 932)
modelo óperon (p. 930)
motivo hélice-volta-hélice (p. 929)
operador *lac* (p. 931)
proteína ativadora de catabólitos (CAP) (p. 933)
quorum sensing (p. 936)
repressão de catabólitos (p. 933)
repressor (p. 930)
repressor *lac* (p. 931)
repressor *pur* (p. 932)

Questões

1. *Genes desaparecidos*. Preveja os efeitos da deleção das seguintes regiões do DNA:

(a) o gene codificador do repressor *lac*

(b) o operador *lac*

(c) o gene codificador de CAP

2. *Concentração mínima*. Calcule a concentração do repressor *lac*, pressupondo que exista uma molécula por célula. Parta do pressuposto de que cada célula de *E. coli* tenha um volume de 10^{-12} cm^3. Você esperaria que a molécula única estivesse livre ou ligada ao DNA?

3. *Contagem dos sítios*. Calcule o número esperado de vezes que um determinado sítio com 8 pares de bases do DNA deve ocorrer no genoma da *E. coli*. Pressuponha que as quatro bases sejam igualmente prováveis. Repita com um sítio de 10 pares de bases e um sítio de 12 pares de bases.

4. *Parecidos, mas não iguais*. O repressor *lac* e o repressor *pur* são proteínas análogas com estruturas tridimensionais muito semelhantes; contudo, exercem efeitos distintos na expressão gênica. Descreva duas diferenças importantes das propriedades de regulação gênica dessas proteínas.

5. *Na contramão*. Alguns compostos denominados anti-indutores se ligam a repressores como o repressor *lac* e inibem a ação dos indutores, ou seja, a transcrição é reprimida e são necessárias concentrações mais elevadas de indutor para induzir a transcrição. Proponha um mecanismo de ação para os anti-indutores.

6. *Repetições invertidas*. Suponha que uma repetição invertida quase perfeita de 20 pares de bases seja observada em uma sequência de DNA. Apresente duas explicações possíveis.

7. *Operadores "quebrados"*. Considere uma mutação hipotética no sítio O_R2 que bloqueia tanto o repressor como a ligação de Cro. Como essa mutação influenciaria a probabilidade de o bacteriófago entrar na fase lítica?

8. *Promotores*. Compare as sequências –10 e –35 do repressor e dos genes Cro no operador direito. Quantas diferenças existem entre essas sequências?

9. *Feedback positivo e negativo*. Qual é o efeito da concentração aumentada de Cro na expressão do gene do repressor λ? Da concentração aumentada de repressor λ na expressão do gene Cro? Da

concentração aumentada do repressor na expressão do gene do repressor λ?

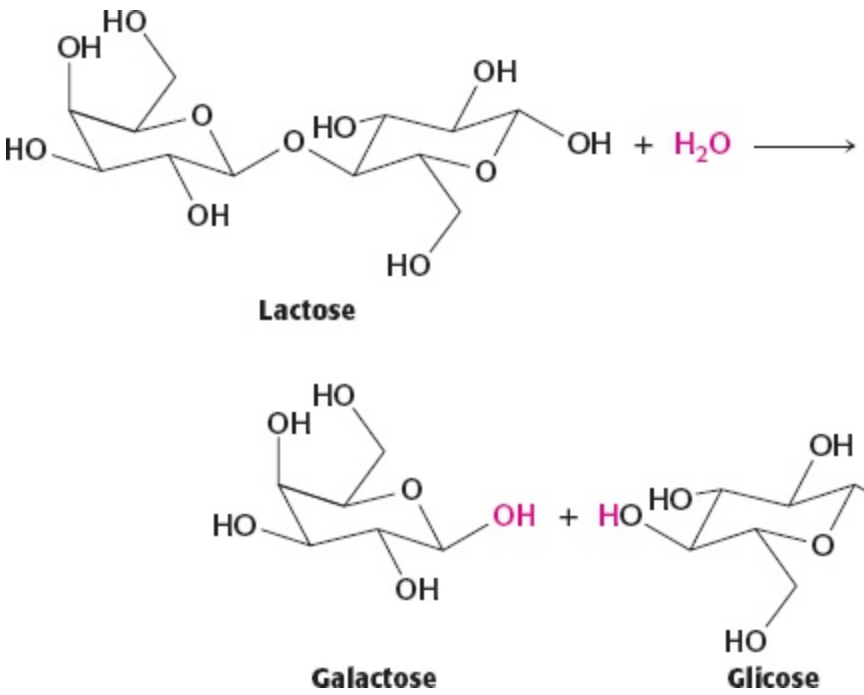
10. *Sem líder*. O mRNA para o repressor começa com 5′-AUG-3′, que codifica o resíduo metionina que começa a proteína. O que é incomum neste início? O que faria o mRNA ser traduzido ou não com eficiência?

11. *Quórum necessário*. Suponha que você tenha vários compostos a serem testados quanto à atividade autoindutora em *Vibrio fischeri*. Proponha um ensaio simples, partindo do pressuposto que você consegue cultivar baixas densidades celulares de *Vibrio fischeri*.

12. *Utilização dos códons*. Existem quatro códons que codificam para a treonina. Considere a sequência líder na Figura 31.22A. Quais códons são utilizados e com que frequência?

Questões sobre mecanismo

13. *Não perca de vista a estereoquímica*. A hidrólise da lactose é catalisada pela β-galactosidase.

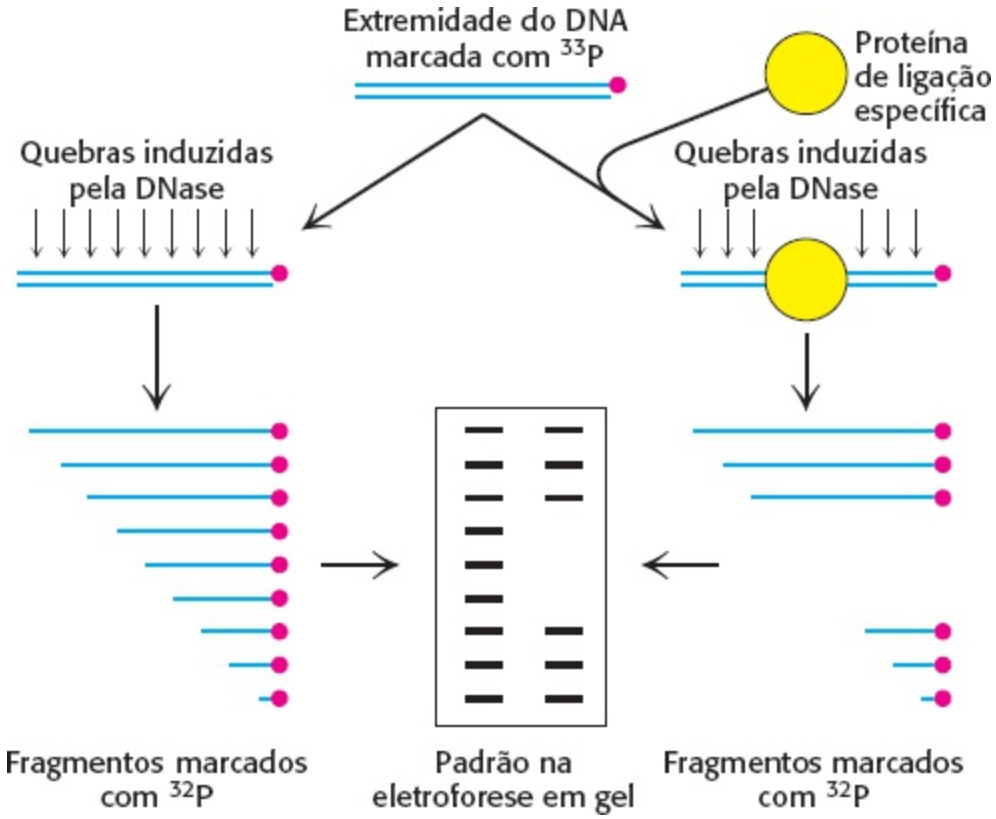


A reação global evolui com retenção ou inversão da configuração? Visto que cada etapa provavelmente evolui com inversão da configuração, o que a alteração global da estereoquímica sugere em relação ao mecanismo? Constatou-se que um resíduo crucial na reação era Glu 537. Proponha um mecanismo para a hidrólise de lactose.

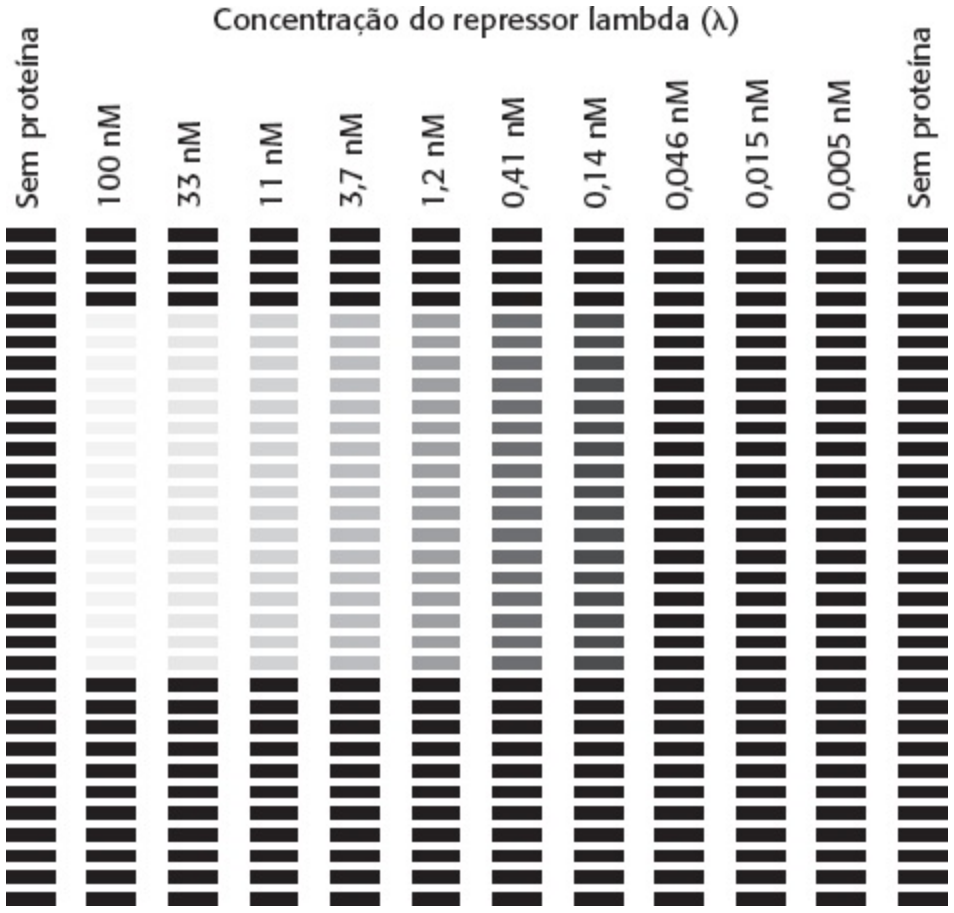
Questões Interpretação de dados

14. *Rastros deixados*. Um método muito valioso de análise das interações entre proteínas e DNA é denominado *DNA footprinting*. Nesse método um fragmento de DNA contendo um potencial sítio de ligação é radiomarcado em uma extremidade. A seguir, o DNA radiomarcado é tratado com um agente que cliva o DNA, como a DNase I, de modo que cada molécula de DNA da população seja cortada apenas uma vez. O mesmo processo de clivagem é realizado na presença de uma proteína que se liga ao DNA. A proteína ligada protege alguns sítios do DNA da clivagem. Os padrões dos

fragmentos de DNA no *pool* clivado de moléculas de DNA são, depois, examinados por eletroforese seguida por autorradiografia.



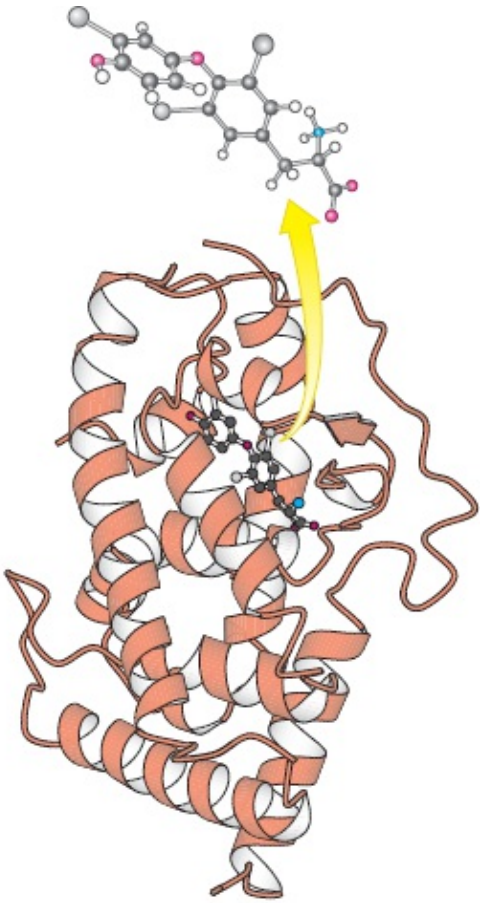
Esse método é aplicado a um fragmento de DNA contendo um único sítio de ligação para o repressor na presença de diferentes concentrações do repressor λ. Os resultados são mostrados adiante:



Faça uma estimativa da constante de dissociação para o complexo DNA–repressor λ e a energia livre padrão da ligação.

Controle da Expressão Gênica em Eucariotos

32



Processos biológicos complexos geralmente demandam o controle coordenado da expressão de muitos genes. A maturação de um girino em uma rã é, em grande parte, controlada pelo hormônio tireoidiano. Esse hormônio regula a expressão gênica por meio de ligação a uma proteína, o receptor de hormônio tireoidiano, mostrado à direita. Em resposta à ligação do hormônio, a proteína se acopla a sítios específicos do DNA no genoma e modula a expressão de genes adjacentes. [Fotografia acima, de Sharon Cummings/Dembinsky Photo Associates.]

SUMÁRIO

32.1 DNA eucariótico é organizado em cromatina

32.2 Fatores de transcrição ligam-se ao DNA e regulam o início da transcrição

32.3 O controle da expressão gênica pode exigir remodelagem da cromatina

32.4 A expressão gênica eucariótica pode ser controlada em níveis pós-transcricionais

Muitos dos aspectos mais importantes e intrigantes da biologia e da medicina atuais, como as vias cruciais para o desenvolvimento de organismos multicelulares, as alterações que diferenciam células normais e células cancerosas e as alterações evolucionárias que resultaram em novas espécies, exigem redes de vias reguladoras de genes. A regulação gênica nos eucariotos é

significativamente mais complexa do que nos procariotos, e isso pode ser explicado de várias maneiras. Em primeiro lugar, os genomas regulados são muito maiores. O genoma de *E. coli* consiste em um cromossomo circular único contendo 4,6 Mb. Esse genoma codifica aproximadamente 2.000 proteínas. Em comparação, um dos eucariotos mais simples, *Saccharomyces cerevisiae*, contém 16 cromossomos de tamanho que varia entre 0,2 a 2,2 Mb (Figura 32.1). O genoma total da levedura tem 12 Mb e codifica aproximadamente 6.000 proteínas. O genoma em uma célula humana contém 23 pares de cromossomos cujo tamanho varia entre 50 e 250 Mb. Existem aproximadamente 23.000 genes nas 3.000 Mb do DNA humano.

Megabases

Comprimento de DNA que consiste em 10^6 pares de bases (se fita dupla) ou 10^6 bases (se fita simples).

1 Mb = 10^3kb = 10^6 bases

Em segundo lugar, enquanto o DNA genômico procariótico é relativamente acessível, o DNA eucariótico está compactado em cromatina, um complexo formado pelo DNA e por um conjunto especial de proteínas (Figura 32.2). Embora os princípios para a formação de cromatina sejam relativamente simples, a estrutura da cromatina de um genoma completo é muito complexa. É importante mencionar que, em uma determinada célula eucariótica, alguns genes e suas regiões reguladoras associadas são relativamente acessíveis para transcrição e regulação, enquanto outros genes são firmemente compactados e inativos. A regulação gênica eucariótica exige, com frequência, a manipulação da estrutura da cromatina.

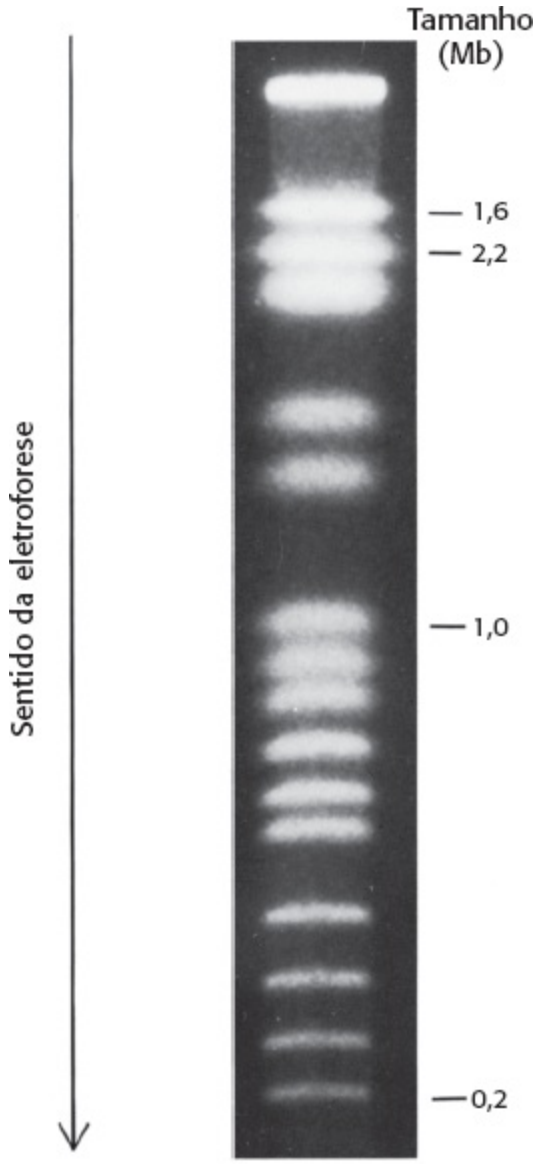


Figura 32.1 Cromossomos de levedura. A eletroforese de campo pulsado possibilita a separação de 16 cromossomos de levedura. [De G. Chu, D. Vollrath, and R. W. Davis. *Science* 234:1582-1585, 1986.]

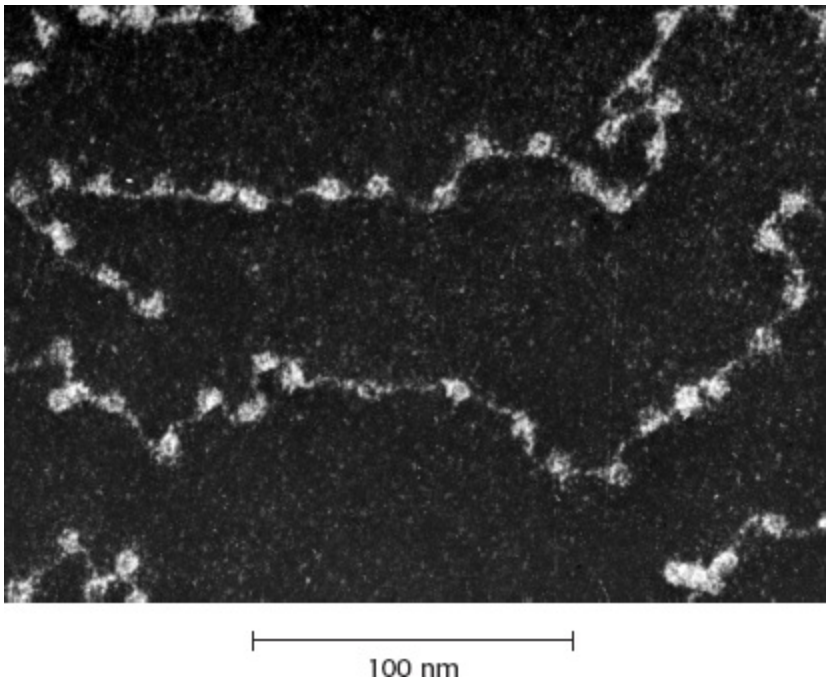


Figura 32.2 Estrutura da cromatina. Micrografia eletrônica de cromatina mostrando seu aspecto de “contas de rosário”. As contas representam os complexos de DNA com proteínas específicas. [Cortesia da Dra. Ada Olins e do Dr. Donald

Olins.]

Uma manifestação dessa complexidade é a existência de muitos tipos de células na maioria dos eucariotos. Um hepatócito, uma célula pancreática e uma célula-tronco embrionária contêm as mesmas sequências de DNA, mas o subconjunto de genes expressos em níveis elevados nas células provenientes do pâncreas, que secreta enzimas digestivas, difere significativamente do subconjunto expresso em níveis elevados no fígado, o local de transporte de lipídios e transdução de energia. As células-tronco embrionárias não expressam quaisquer subconjuntos de genes em níveis elevados. Os genes mais expressos nas células-tronco embrionárias são do tipo constitutivo (*housekeeping*), que está envolvido na manutenção do citoesqueleto e em processos como tradução (Tabela 32.1). A existência de células estáveis é consequente a diferenças no *epigenoma*, a diferenças na estrutura da cromatina e a modificações nas ligações covalentes do DNA, não na própria sequência do DNA.

Além disso, os genes eucarióticos não costumam ser organizados em *óperons*. Na verdade, genes que codificam proteínas em etapas ao longo de uma determinada via metabólica são encontrados frequentemente em todo o genoma. Essa característica demanda a atuação de outros mecanismos para regular os genes de forma coordenada.

Apesar dessas diferenças, alguns aspectos da regulação gênica em eucariotos são muito semelhantes aos dos procariotos. As proteínas ativadoras e supressoras que reconhecem sequências específicas de DNA são essenciais para muitos processos de regulação gênica. Neste capítulo descreveremos primeiro a estrutura da cromatina. A seguir, apresentaremos os fatores de transcrição – as proteínas de ligação com o DNA que são muito semelhantes às proteínas procarióticas que descrevemos no Capítulo 31. Os fatores de transcrição eucariótica têm ações diretas (interagem com o maquinário transcricional) ou indiretas (influenciam a estrutura da cromatina). Por fim, analisaremos alguns mecanismos reguladores gênicos pós-transcricionais, inclusive aqueles baseados em microRNA, uma classe importante de moléculas reguladoras gênicas descoberta recentemente.

32.1 DNA eucariótico é organizado em cromatina

O DNA eucariótico está firmemente ligado a um grupo de pequenas proteínas básicas denominadas *histonas*. Na verdade, as histonas constituem metade da massa de um cromossomo eucariótico. O complexo total de DNA e proteína associada de uma célula é denominado *cromatina*. A cromatina compacta e organiza o DNA eucariótico e sua presença tem repercussões substanciais na regulação gênica.

Tabela 32.1 Genes codificadores de proteínas de expressão elevada do pâncreas, do fígado e das células-tronco embrionárias (como porcentagem do *pool* total de mRNA).

Classe	Proteínas expressas no pâncreas	%	Proteínas expressas no fígado	%	Proteínas expressas nas células-tronco embrionárias	%
1	Procarboxipeptidase A1	7,6	Albumina	3,5	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	0,7

2	Tripsinogênio pancreático 2	5,5	Apolipoproteína A-I	2,8	Fator de alongamento da tradução 1α1	0,6
3	Quimotripsinogênio	4,4	Apolipoproteína C-I	2,5	Tubulina α	0,5
4	Tripsina pancreática 1	3,7	Apolipoproteína C-III	2,1	Proteína tumoral controlada por tradução (translationally controled tumor protein)	0,5
5	Elastase IIIB	2,4	ATPase 6/8	1,5	Ciclofilina A	0,4
6	Protease E	1,9	Citocromo oxidase 3	1,1	Cofilina	0,4
7	Lipase pancreática	1,9	Citocromo oxidase 2	1,1	Nucleofosmina	0,3
8	Procarboxipeptidase B	1,7	α_1-antitripsina	1,0	Conexina 43	0,3
9	Amilase pancreática	1,7	Citocromo oxidase 1	0,9	Fosfoglicerato mutase	0,2
10	Lipase estimulada por sais biliares	1,4	Apolipoproteína E	0,9	Fator de alongamento da tradução 1 β_2	0,2

Fontes: Os dados sobre o pâncreas são provenientes de V. E. Velculescu, L. Zhang, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler. Science 270:484-487. Os dados sobre o fígado são provenientes de T. Yamashita, S. Hashimoto, S. Kaneko, S. Nagai, N. Toyoda, T. Suzuki, K. Kobayashi, and K. Matsushima. Biochem. Biophy. Res. Commun. 269:110-116, 2000. Os dados sobre as células-tronco provêm de M. Richards, S. P. Tan, J. H. Han, W. K. Chan, and A. Bongso. Stem Cells 22:51-64, 2004.

Nucleossomas são complexos de DNA e histonas

A cromatina é constituída por unidades repetidas, cada uma contendo 200 pb de DNA e duas cópias de cada uma das quatro histonas H2A, H2B, H3 e H4. As histonas apresentam características notavelmente básicas porque 25% dos resíduos em cada histona são arginina ou lisina, aminoácidos com carga elétrica positiva que interagem intensamente com o DNA de carga elétrica negativa. O complexo proteico é denominado *octâmero de histona*. As unidades repetidas do octâmero de histona e o DNA associado são denominados *nucleossomas*. À microscopia eletrônica, a cromatina assemelha-se a contas de rosário (Figura 32.2); cada "conta" tem um diâmetro aproximado de 100 Å. A digestão parcial da cromatina por DNase resulta em separação das "contas". Essas partículas consistem em fragmentos de DNA com comprimento de aproximadamente 200 pb ligados ao octâmero de histona. A digestão mais prolongada resulta em um fragmento de DNA mais curto (145 pb) ligado ao octâmero. O complexo menor formado pelo octâmero de histona e pelo fragmento de DNA com 145 pb é denominado *partícula central do nucleossoma*. O DNA que conecta as partículas centrais na cromatina não digerida é denominado DNA ligante. A histona H1 acopla-se, em parte, ao DNA ligante.

O DNA enrola-se em torno de octâmeros de histona para formar nucleossomas

A estrutura global do nucleossoma foi revelada por estudos com microscopia eletrônica e cristalografia de raios X. Os pioneiros nesses estudos foram Aaron Klug e seus colaboradores. Mais recentemente a estrutura tridimensional de uma partícula reconstituída do cerne do nucleossoma (Figura 32.3) foi determinada com uma resolução maior por métodos de difração de raios X. Os quatro tipos de histona que constituem o cerne da proteína são homólogos e apresentam estruturas semelhantes (Figura 32.4). As oito histonas no cerne estão dispostas em um tetrâmero $(H3)_2(H4)_2$ e um par de dímeros H2A-H2B. O tetrâmero e os dímeros reúnem-se e formam um plano inclinado super-helicoidal para a esquerda em torno do qual o DNA se enrola. Além disso, cada histona apresenta uma "cauda" aminoterminal que se estende para fora da estrutura central. Essas caudas são flexíveis e contêm vários resíduos lisina e arginina. Como veremos, *modificações covalentes dessas caudas têm uma participação crucial na regulação da expressão gênica*.

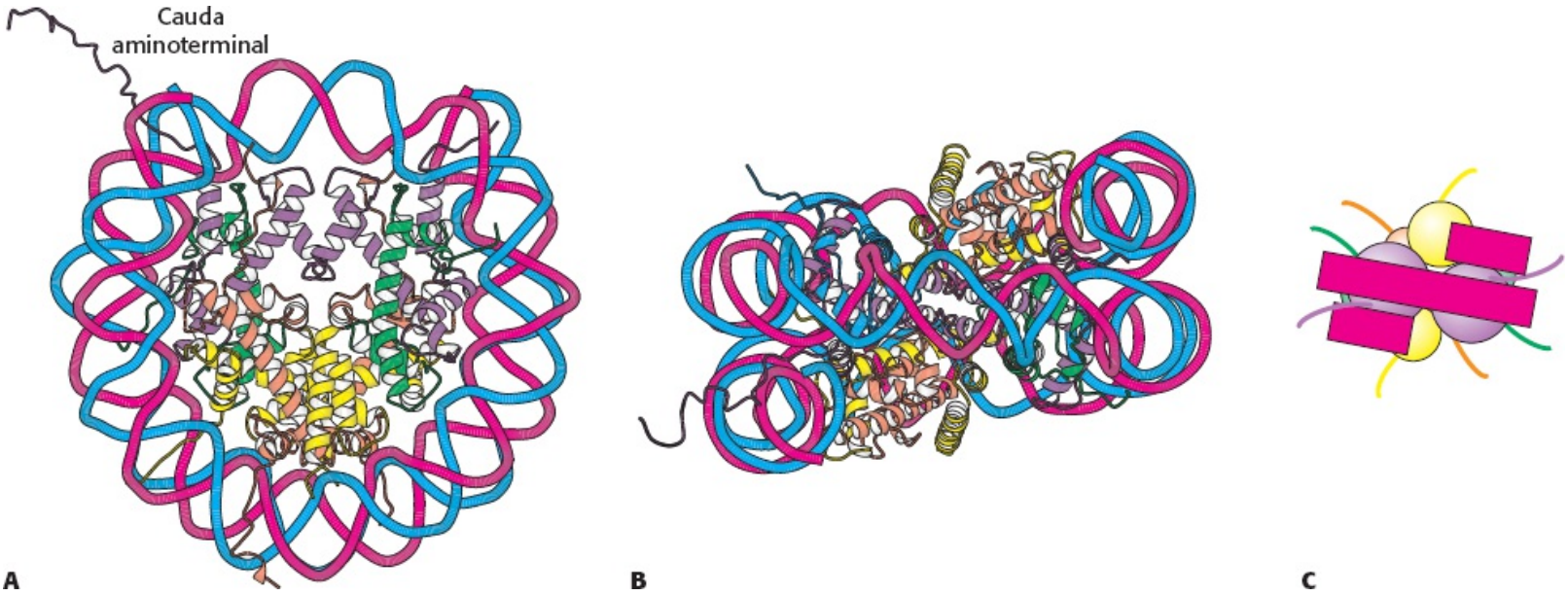


Figura 32.3 Partícula central do nucleossoma. A estrutura consiste em um cerne de oito proteínas histona circundadas por DNA. **A**. DNA enrolado em torno do cerne de histona. **B**. Vista relacionada com (**A**) uma rotação de 90°. *Observe* que o DNA forma uma super-hélice para a esquerda enquanto se enrola em torno do cerne. **C**. Visão esquemática. [Desenhada a partir de 1AOI.pdb.]

O DNA forma uma super-hélice rodada para a esquerda enquanto se enrola em torno da parte externa do octâmero de histona. O cerne da proteína forma contatos com a superfície interna da super-hélice do DNA em muitos pontos, sobretudo ao longo do arcabouço fosfodiéster e do sulco menor. Nucleossomas formam-se em quase todos os sítios de DNA, embora algumas sequências sejam preferidas porque os dinucleotídios (dispostos como degraus) estão espaçados apropriadamente e favorecem o arqueamento em torno do cerne de histona. Uma histona com uma estrutura diferente das outras, denominada histona H1, "prende" o nucleossoma na posição na qual o DNA ligante entra e sai. As sequências de aminoácidos das histonas, inclusive suas caudas aminoterminais, são significativamente preservadas desde as leveduras até os seres humanos.

A formação da espiral de DNA em torno do cerne do nucleossoma contribui para a compactação do DNA porque reduz seu comprimento linear. Um segmento estendido de 200 pb de DNA teria um comprimento de aproximadamente 680 Å. A formação de espiral desse DNA em torno do octâmero

de histona reduz o comprimento em aproximadamente 100 Å ao longo da dimensão longa do nucleossoma. Portanto, o DNA é compactado em um fator de 7. Os cromossomos humanos na metáfase, que estão muito condensados, são compactados por um fator de 10^4. Obviamente, o nucleossoma é apenas a primeira etapa na compactação de DNA. Qual é a etapa seguinte? Os próprios nucleossomas estão dispostos em um arranjo helicoidal com cerca de 360 Å, formando uma série de camadas sobrepostas verticalmente com cerca de 110 Å de distância (Figura 32.5). O enovelamento dessas fibras de nucleossomas em alças compacta ainda mais o DNA.

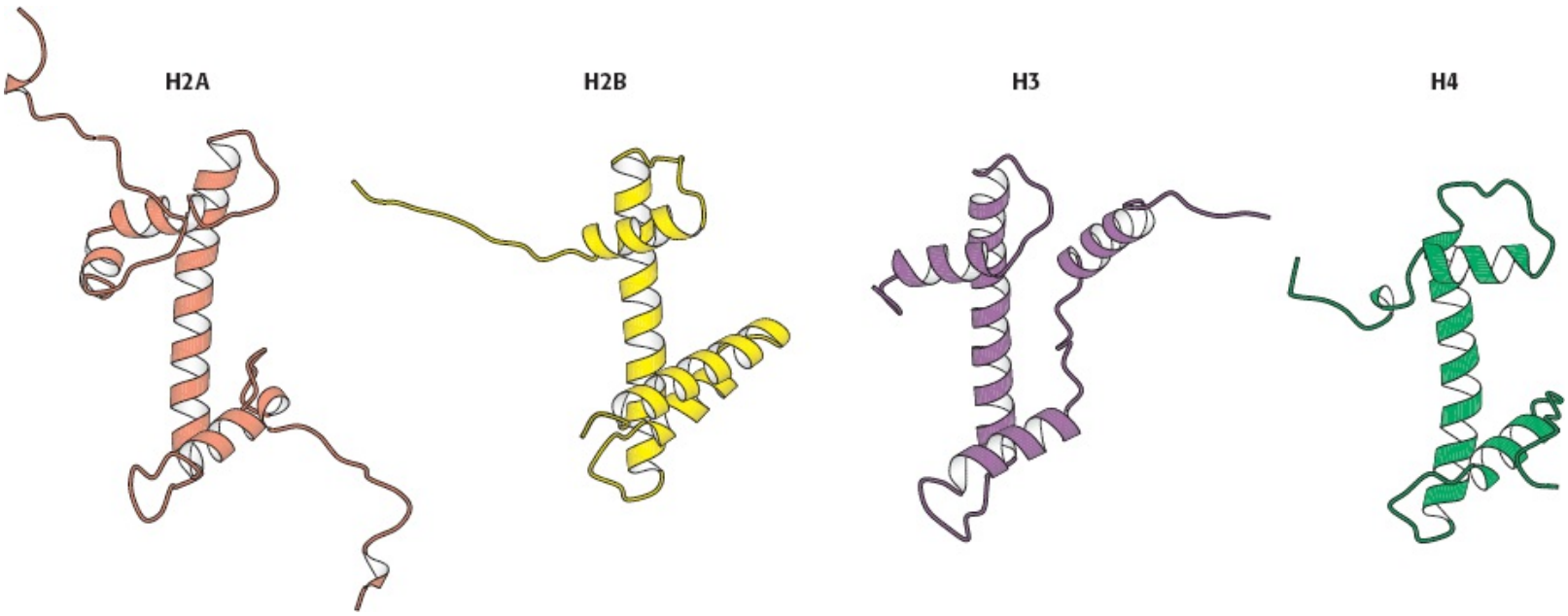


Figura 32.4 Histonas homólogas. Histonas H2A, H2B, H3 e H4 adotam uma estrutura tridimensional semelhante como consequência de ancestrais em comum. Partes das caudas nas terminações das proteínas não são mostradas. [Desenhada a partir de 1AOI.pdb.]

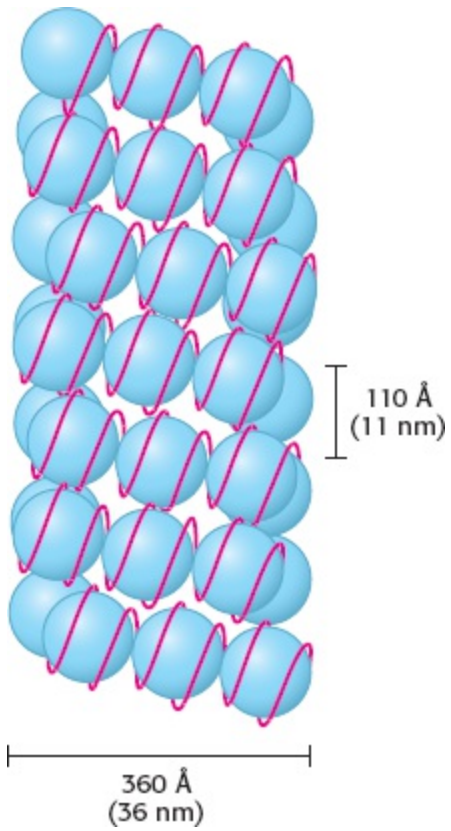


Figura 32.5 Estrutura de cromatina de ordem superior. Modelo proposto para a cromatina disposta em um arranjo

helicoidal constituído por seis nucleossomas por volta da hélice. A dupla-hélice do DNA (mostrada em vermelho) está enrolada em torno de cada octâmero de histona (mostrado em azul). [De J. T. Finch e A. Klug. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:1897-1901,1976.]

A espiral de DNA em torno do octâmero de histona (na forma de uma hélice rodada para a esquerda) também armazena super-hélices negativas. Se o DNA em um nucleossoma for retificado, o DNA será subenrolado (*underwound*). Esse subenrolamento (*underwinding*) é exatamente o que é necessário para separar os dois filamentos de DNA durante a replicação e a transcrição.

32.2 Fatores de transcrição ligam-se ao DNA e regulam o início da transcrição

Os *fatores de transcrição* que ligam DNA são cruciais para a regulação gênica nos eucariotos, assim como o são nos procariotos. Todavia, os fatores de transcrição eucariótica desempenham funções diferentes. Primeiro, enquanto os sítios de ligação com o DNA cruciais ao controle da expressão gênica nos procariotos costumam se localizar próximo aos promotores, os sítios de ligação nos eucariotos podem estar localizados mais distantes dos promotores e conseguem exercer suas ações a distância. Segundo, a maioria dos genes procarióticos é regulada por fatores de transcrição únicos e múltiplos genes em uma via são expressados de modo coordenados porque esses genes são, com frequência, transcritos como parte de um mRNA policistrônico. Nos eucariotos, a expressão de cada gene é tipicamente controlada por múltiplos fatores de transcrição e a expressão coordenada de genes diferentes depende da existência de sítios de ligação para fatores de transcrição semelhantes em cada gene do conjunto. Terceiro, nos procariotos, os fatores de transcrição geralmente interagem diretamente com a RNA polimerase. Nos eucariotos alguns fatores de transcrição interagem diretamente com a RNA polimerase, enquanto outros interagem com outras proteínas associadas à RNA polimerase, e ainda existem aqueles que modificam a estrutura da cromatina. Agora examinemos mais detalhadamente os fatores de transcrição dos eucariotos.

Os fatores de transcrição nos eucariotos consistem, de modo geral, em vários domínios. O *domínio de ligação do DNA* conecta-se a sequências reguladoras que podem ser adjacentes ao promotor ou podem estar a alguma distância dele. Mais frequentemente, os fatores de transcrição incluem domínios adicionais que ajudam a ativar a transcrição. Quando um fator de transcrição está acoplado ao DNA, seu *domínio de ativação* promove a transcrição por meio de interação com a RNA polimerase II, de interação com outras proteínas associadas ou de modificação da estrutura local da cromatina.

Nos eucariotos uma gama de estruturas de ligação com o DNA é empregada pelas proteínas que ligam o DNA

As estruturas de muitas proteínas que ligam o DNA em eucariotos já foram determinadas, e foi observada uma gama de domínios (*motifs)* estruturais; contudo, focalizaremos três que apresentam as características em comum e a diversidade desses *motifs*. A primeira classe de unidade de ligação com DNA em eucariotos a ser descrita é o *homeodomínio* (Figura 32.6). A estrutura desse domínio e seu modo de reconhecimento do DNA são muito semelhantes aos das proteínas hélice-volta-hélice dos procariotos. Nos eucariotos, as proteínas de homeodomínio formam, com frequência, estruturas heterodiméricas, algumas vezes com outras proteínas de homeodomínio, que reconhecem sequências

assimétricas de DNA.

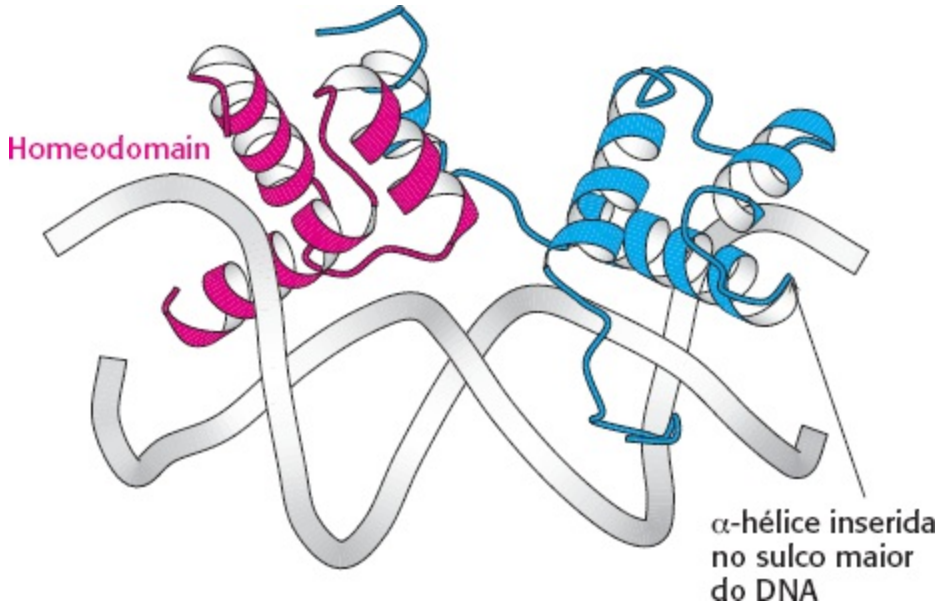


Figura 32.6 Estrutura de homeodomínio. A estrutura de um heterodímero formado por dois domínios de ligantes de DNA diferentes, cada um com base em um homeodomínio. *Observe* que cada homeodomínio apresenta um *motif* hélice-volta-hélice inserido no sulco maior do DNA. [Desenhada a partir de 1AKH.pdb.]

A segunda classe de unidade eucariótica de ligantes de DNA compreende as *proteínas com zíper de leucina básica (bZip)* (Figura 32.7). Essa unidade de ligação com o DNA consiste em um par de longas α-hélices. A primeira parte de cada α-hélice é uma região básica localizada no sulco maior do DNA e faz os contatos responsáveis pelo reconhecimento do sítio do DNA. A segunda parte de cada α-hélice forma uma estrutura espiralada com seu par. Como essas unidades são, muitas vezes, estabilizadas por resíduos de leucina apropriadamente espaçados, essas estruturas costumam ser denominadas *zíperes de leucina*.

A classe final de unidades eucarióticas de ligantes de DNA que discutiremos consiste nos *domínios do tipo zinc-finger* Cys_2His_2 (dedos de zinco) (Figura 32.8). Uma unidade ligante de DNA dessa classe consiste em conjuntos repetidos em série de pequenos domínios, cada um ligando-se a um íon zinco por meio de conjuntos conservados de dois resíduos cisteína e dois resíduos histidina. Esses domínios, frequentemente denominados *domínios do tipo zinc-finger*, formam uma cadeia que acompanha o sulco maior do DNA. Uma α-hélice de cada domínio estabelece contato específico com as bordas dos pares de bases no sulco. Algumas proteínas contêm 10 ou mais domínios do tipo *zinc-finger*, possibilitando que entrem em contato com longos trechos de DNA. O genoma humano codifica várias centenas de proteínas que contêm domínio do tipo *zinc-finger* dessa classe. Abordaremos outra classe de domínio ligante de DNA a base de zinco quando descrevermos os receptores nucleares de hormônio na Seção 32.3.

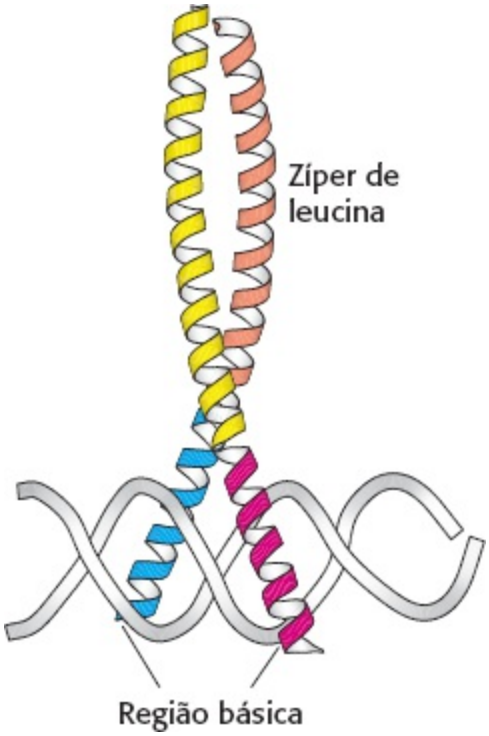


Figura 32.7 Zíper de leucina básica. Esse heterodímero é constituído por duas proteínas com zíper de leucina básica. *Observe* que a região básica está localizada no sulco maior do DNA. O zíper de leucina estabiliza o dímero proteico. [Desenhada a partir de 1FOS.pdb.]

Domínios de ativação interagem com outras proteínas

Os domínios de ativação dos fatores de transcrição geralmente recrutam outras proteínas que promovem a transcrição. Em alguns casos esses domínios de ativação interagem diretamente com a RNA polimerase II ou com proteínas associadas. Os domínios de ativação atuam por meio de proteínas intermediárias que conectam os fatores de transcrição com a polimerase. Um alvo importante dos ativadores é o *mediador*, um complexo de 25 a 30 subunidades conservadas desde as leveduras até os seres humanos, que conecta os fatores de transcrição com a RNA polimerase II ligada ao promotor (Figura 32.9).

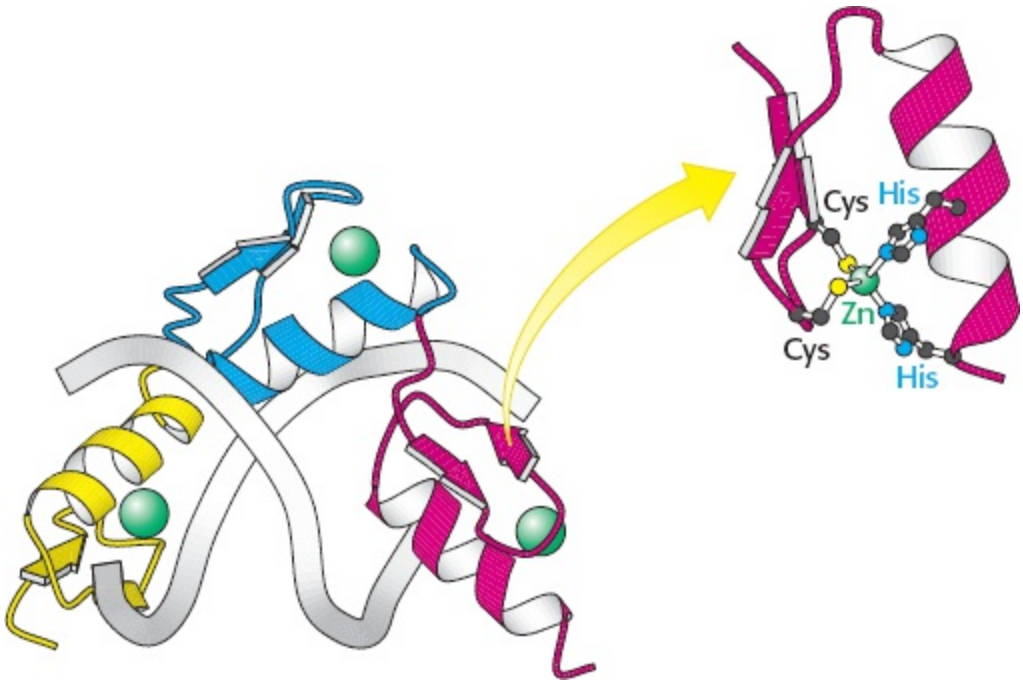


Figura 32.8 Domínio do tipo *zinc-finger*. Um domínio ligante de DNA constituído por três domínios do tipo *zinc-finger* Cys_2His_2 (mostrados em amarelo, azul e vermelho) é mostrado em um complexo com o DNA. Cada domínio do tipo *zinc-finger* é estabilizado por um íon zinco ligado (mostrado em verde) por meio de interações com dois resíduos de cisteína e dois resíduos de histidina. *Observe* como a proteína se enrola em torno do DNA no sulco maior. [Desenhada a partir de 1AAY.pdb.]

Os domínios de ativação são menos conservados do que os domínios de ligantes de DNA. Na verdade, foi encontrada até o momento mínima semelhança entre as sequências. Por exemplo, os domínios de ativação podem ser ácidos, hidrofóbicos, ricos em glutamina ou ricos em prolina. Não obstante, determinados detalhes são comuns entre eles. Primeiro, eles são frequentemente *redundantes*, ou seja, uma parte do domínio de ativação pode ser deletada sem perda funcional. Segundo, eles são *modulares* e conseguem ativar a transcrição quando pareados com vários tipos de domínios ligantes de DNA. Terceiro, os domínios de ativação podem *agir de modo sinérgico*, ou seja, dois domínios de ativação agindo junto exercem um efeito mais forte do que cada um isoladamente.

Até agora consideramos o caso no qual o controle gênico acentua o nível de expressão de um gene. Em muitos casos, a expressão de um gene tem de ser reduzida por meio de bloqueio da transcrição. Os agentes nesse caso são *repressores transcricionais*. Como os ativadores, os repressores transcricionais atuam, em muitos casos, por meio de alteração da estrutura da cromatina.

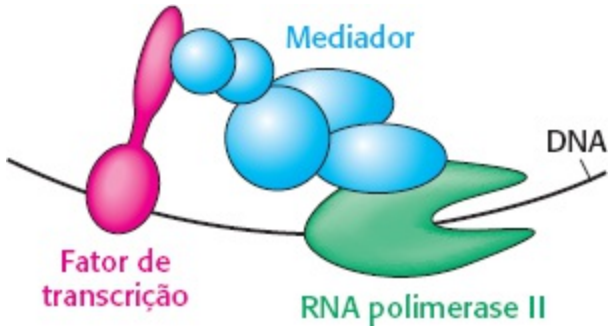


Figura 32.9 Mediador. O mediador, um grande complexo de subunidades proteicas, comunica os fatores de transcrição com domínios de ativação com a RNA polimerase II. Essas interações ajudam a recrutar e estabilizar a RNA polimerase II próximo a genes específicos que depois são transcritos.

Múltiplos fatores de transcrição interagem com regiões reguladoras eucarióticas

O complexo de transcrição basal descrito no Capítulo 29 inicia a transcrição em uma frequência baixa. É preciso lembrar que vários fatores de transcrição gerais se acoplam a RNA polimerase II para formar o complexo basal de transcrição. Outros fatores de transcrição precisam se ligar a outros sítios que podem estar perto ou muito longe do promotor para que um gene alcance uma taxa mais elevada de síntese de mRNA. Ao contrário dos reguladores da transcrição procariótica, poucos fatores de transcrição eucariótica exercem efeitos por si só sobre a transcrição. Na verdade, cada fator recruta outras proteínas com o propósito de acumular grandes complexos que interagem com o maquinário transcricional e ativam a transcrição.

Uma vantagem importante desse modo de regulação é que uma determinada proteína reguladora pode exercer efeitos diferentes, dependendo das outras proteínas existentes na mesma célula. Esse fenômeno, denominado *controle combinatorial*, é essencial para organismos multicelulares que possuem muitos tipos celulares diferentes. Mesmo em organismos unicelulares, como a levedura, o

controle combinatorial possibilita a geração de tipos celulares distintos.

Os amplificadores conseguem estimular a transcrição em tipos celulares específicos

Os fatores de transcrição conseguem, com frequência, atuar mesmo se seus sítios de ligação estiverem a uma distância considerável do promotor. Esses sítios reguladores distantes são denominados amplificadores (*enhancers*) (Capítulo 29). Os amplificadores atuam como sítios de ligação para fatores de transcrição específicos. Um amplificador só é efetivo nos tipos celulares específicos nos quais proteínas reguladoras apropriadas são expressadas. Em muitos casos essas proteínas ligantes de DNA influenciam a iniciação da transcrição ao modificarem a estrutura da cromatina local e exporem um gene ou seus sítios reguladores em vez de promoverem interações diretas com a RNA polimerase. Esse mecanismo explica a capacidade dos amplificadores atuarem a distância.

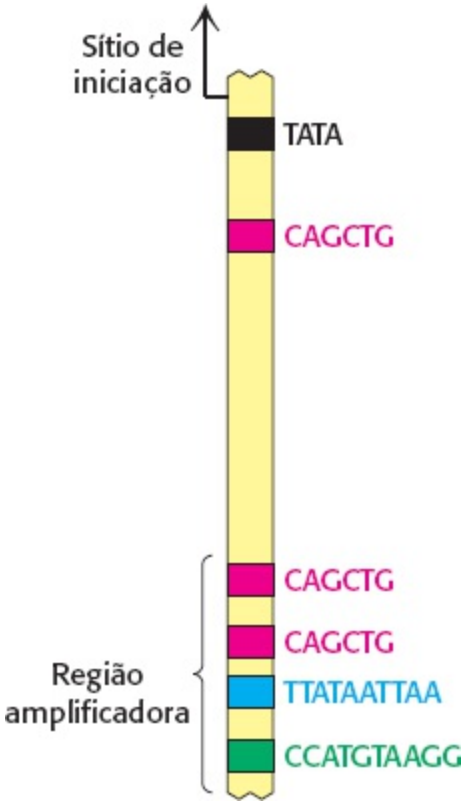


Figura 32.10 Sítios de ligação do amplificador. Uma estrutura esquemática da região a 1 kb (no sentido 5′) do sítio de iniciação para o gene da creatinoquinase muscular. Um sítio de ligação da forma 5′-CAGCTG-3′ é encontrado perto da caixa TATA (sequência de TATA). A região do amplificador (*enhancer*) a montante contém dois sítios de ligação para a mesma proteína e dois sítios de ligação adicionais para outras proteínas.

As propriedades dos amplificadores são elucidadas por estudos do amplificador que controla a isoforma muscular da creatinoquinase (Figura 32.10). Estudos de mutagênese e de outros tipos revelaram a existência de um amplificador entre os pares de bases 1.350 e 1.050 a montante do sítio de iniciação do gene para essa enzima. A inserção experimental desse amplificador próximo a um gene que normalmente não é expresso em células musculares é suficiente para fazer com que o gene seja expresso em níveis elevados nas células musculares, mas não em outras células (Figura 32.11).

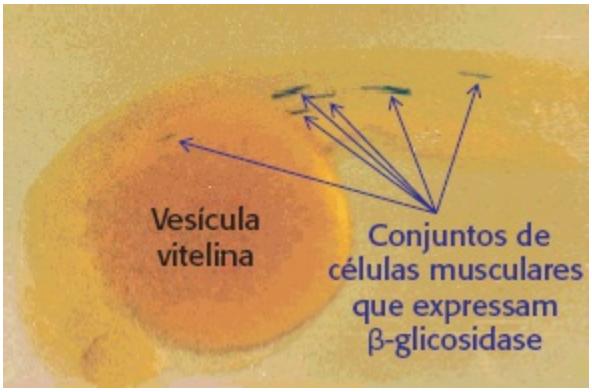


Figura 32.11 Demonstração experimental da função do amplificador. Um promotor da creatinoquinase muscular desencadeia artificialmente a transcrição de β-glicosidase em um embrião do peixe *Danio rerio* (peixe-zebra). Apenas conjuntos específicos de células musculares produzem β-glicosidase, como visualizado pela formação do produto azul no tratamento do embrião com X-Gal. [De F. Müller, D. W. Williamson, J. Kobolák, L. Gauvry, G. Goldspink, L. Orbán, and N. MacLean. *Mol. Reprod. Dev*. 47;404-412, 1997.]

Células-tronco pluripotentes induzidas podem ser geradas pela introdução de quatro fatores de transcrição em células diferenciadas

Uma aplicação importante que mostra o poder dos fatores de transcrição é o desenvolvimento de *células-tronco pluripotentes induzidas* (iPS, *do inglês induced pluripotent stem cells*). As células-tronco pluripotentes têm a capacidade de se diferenciar em muitos tipos celulares distintos se recebem tratamento apropriado. Células previamente isoladas de embriões são altamente pluripotentes. Os pesquisadores identificaram dúzias de genes nas células-tronco embrionárias que (quando expressos) contribuem para essa pluripotência. Em um experimento notável com células de camundongo em 2006 e com células humanas em 2007, Shinya Yamanaka demonstrou que apenas quatro genes do conjunto todo conseguia induzir a pluripotência em células cutâneas já diferenciadas. Yamanaka introduziu genes codificadores de quatro fatores de transcrição em células cutâneas denominadas fibroblastos. Os fibroblastos se desdiferenciaram em células com características quase idênticas às apresentadas pelas células-tronco embrionárias (Figura 32.12).

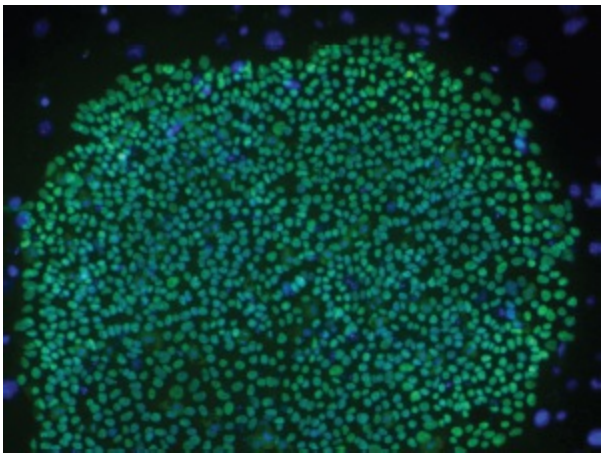


Figura 32.12 Células-tronco pluripotentes induzidas. Micrografia de células-tronco pluripotentes induzidas humanas coradas em verde para um fator de transcrição que é característico das células pluripotentes. [De K. Takahashi *et al*., *Cell* 131; 861-872, 2007; com permissão de Elsevier, cortesia de Shinya Yamanaka, Kyoto University.]

Essas células iPS representam valiosas ferramentas para fins de pesquisa e, potencialmente, uma nova classe de agentes terapêuticos. O conceito proposto é que uma amostra dos fibroblastos de um

paciente poderia ser facilmente isolada e convertida em células iPS. A seguir, essas células iPS poderiam ser diferenciadas no tipo celular desejado e transplantadas para o paciente. Essa abordagem poderia, por exemplo, ser utilizada na restauração de uma classe específica de células nervosas depletadas por doenças neurodegenerativas. Embora a pesquisa das células iPS ainda esteja em seus primórdios, é muito promissora como uma possível abordagem terapêutica de muitas enfermidades comuns e de difícil tratamento.

32.3 O controle da expressão gênica pode exigir remodelagem da cromatina

As observações mais antigas sugeriam que a estrutura da cromatina era importante no controle da expressão gênica em eucariotos. O DNA que está densamente compactado na cromatina é menos suscetível à clivagem pela DNase I (enzima que fragmenta o DNA de forma inespecífica). As regiões adjacentes aos genes que estão sendo transcritos são mais sensíveis à clivagem pela DNase I do que outros sítios no genoma, sugerindo que o DNA nessas regiões está menos compactado e mais acessível às proteínas. Além disso, alguns sítios, geralmente a 1 kb do sítio de iniciação de um gene ativo, são extremamente sensíveis a DNase I e a outras nucleases. Esses *sítios hipersensíveis* correspondem às regiões com poucos nucleossomas ou que contêm nucleossomas cuja conformação foi modificada. *Sítios hipersensíveis são específicos para as diferentes células e regulados ao longo do desenvolvimento*. Os genes da globina nos precursores das células eritroides de embriões de frango com 20 h, por exemplo, são insensíveis à DNase I. Não obstante, quando a síntese de hemoglobina começa às 35 h, as regiões adjacentes a esses genes se tornam muito suscetíveis à digestão. Em tecidos como o tecido cerebral que não produzem hemoglobina, os genes da globina permanecem resistentes à DNase I durante o desenvolvimento até a vida adulta. Esses estudos sugerem que o relaxamento da estrutura da cromatina é um pré-requisito para a expressão gênica.

Experimentos recentes elucidaram a participação da estrutura da cromatina na regulação do acesso aos sítios de ligação com DNA. Os genes necessários para a utilização de galactose na levedura são ativados por um fator de transcrição denominado GAL4, que reconhece os sítios de ligação com DNA com duas sequências 5′-CGG-3′ em fitas complementares separados por 11 pares de bases (Figura 32.13). Aproximadamente 4.000 sítios de ligação potenciais de GAL4 do tipo 5′-CGG$(N)_{11}$CCG-3′ são encontrados no genoma de levedura, mas apenas 10 deles regulam os genes necessários para o metabolismo de galactose. Como o GAL4 é direcionado para esta pequena fração dos potenciais sítios de ligação? Essa questão é solucionada por meio de uma técnica denominada *imunoprecipitação de cromatina* (ChIP; Figura 32.14). GAL4 forma, primeiro, ligações cruzadas com seus sítios de ligação com DNA na cromatina. A seguir, o DNA é clivado em pequenos fragmentos, e anticorpos contra GAL4 são empregados para isolar os fragmentos de cromatina que contêm GAL4. As ligações cruzadas são revertidas e o DNA é isolado e caracterizado. Os resultados desses estudos revelam que apenas cerca de 10 dos 4.000 sítios potenciais de GAL4 são ocupados por GAL4 quando as células estão crescendo em galactose. Mais de 99% dos sítios parecem estar bloqueados, presumivelmente pela estrutura local da cromatina. Assim sendo, enquanto nos procariotos todos os sítios parecem estar igualmente acessíveis, a estrutura da cromatina blinda um grande número dos sítios de ligação potenciais nas células eucarióticas. GAL4 é impedida de se ligar a sítios que não são importantes no metabolismo da galactose. Essas e outras evidências revelam que a estrutura da cromatina é modificada em genes ativos (em comparação com genes

inativos).

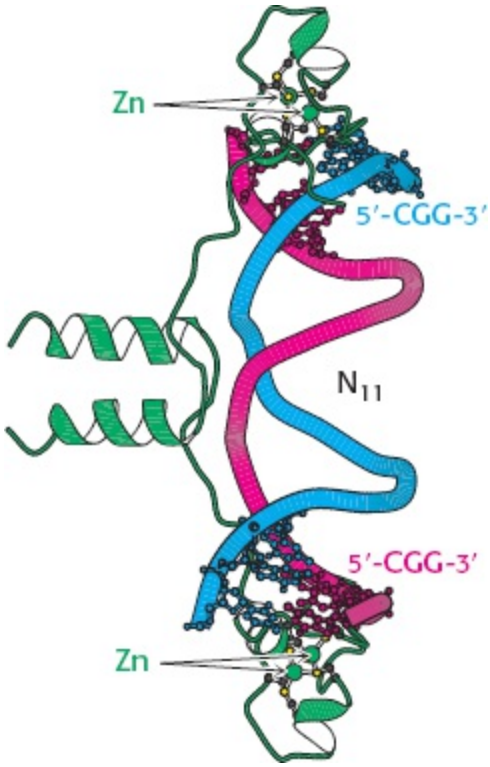
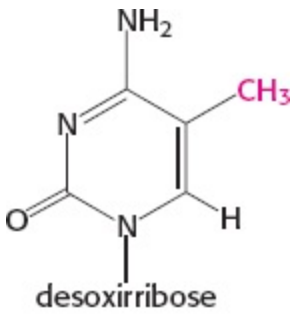


Figura 32.13 Sítios de ligação de GAL4. O fator de transcrição da levedura GAL4 liga-se às sequências de DNA da forma 5′-CGC(N)$_{11}$CCG-3′. Dois domínios à base de zinco são encontrados na região de ligação com o DNA dessa proteína. *Observe* que esses domínios entram em contato com as sequências 5′-CGG-3′, deixando o centro do sítio intocado. [Desenhada a partir de 1D66.pdb.]

A metilação do DNA consegue modificar os padrões de expressão gênica

O grau de metilação do DNA é outro mecanismo, além da compactação com histonas, de inibir a expressão gênica inapropriada para um tipo específico de célula. O carbono 5 da citosina pode ser metilado por metiltransferases específicas. Aproximadamente 70% das sequências 5′-CpG-3′ (nas quais "p" representa o resíduo fosfato no arcabouço do DNA) nos genomas dos mamíferos são metilados. Entretanto, a distribuição dessas citosinas metiladas varia de acordo com o tipo de célula. Considere o gene da β-globina. Nas células que expressam ativamente hemoglobina, a região que vai de aproximadamente 1 kb antes do sítio de iniciação até aproximadamente 100 pb após o sítio de iniciação é menos metilada do que a região correspondente nas células que não expressam esse gene. A ausência relativa de 5-metilcitosinas nas proximidades do sítio de iniciação é denominada *hipometilação*. O grupo metila da 5-metilcitosina projeta-se para dentro do sulco maior onde pode facilmente interferir na ligação das proteínas que estimulam a transcrição.



5-Metilcitosina

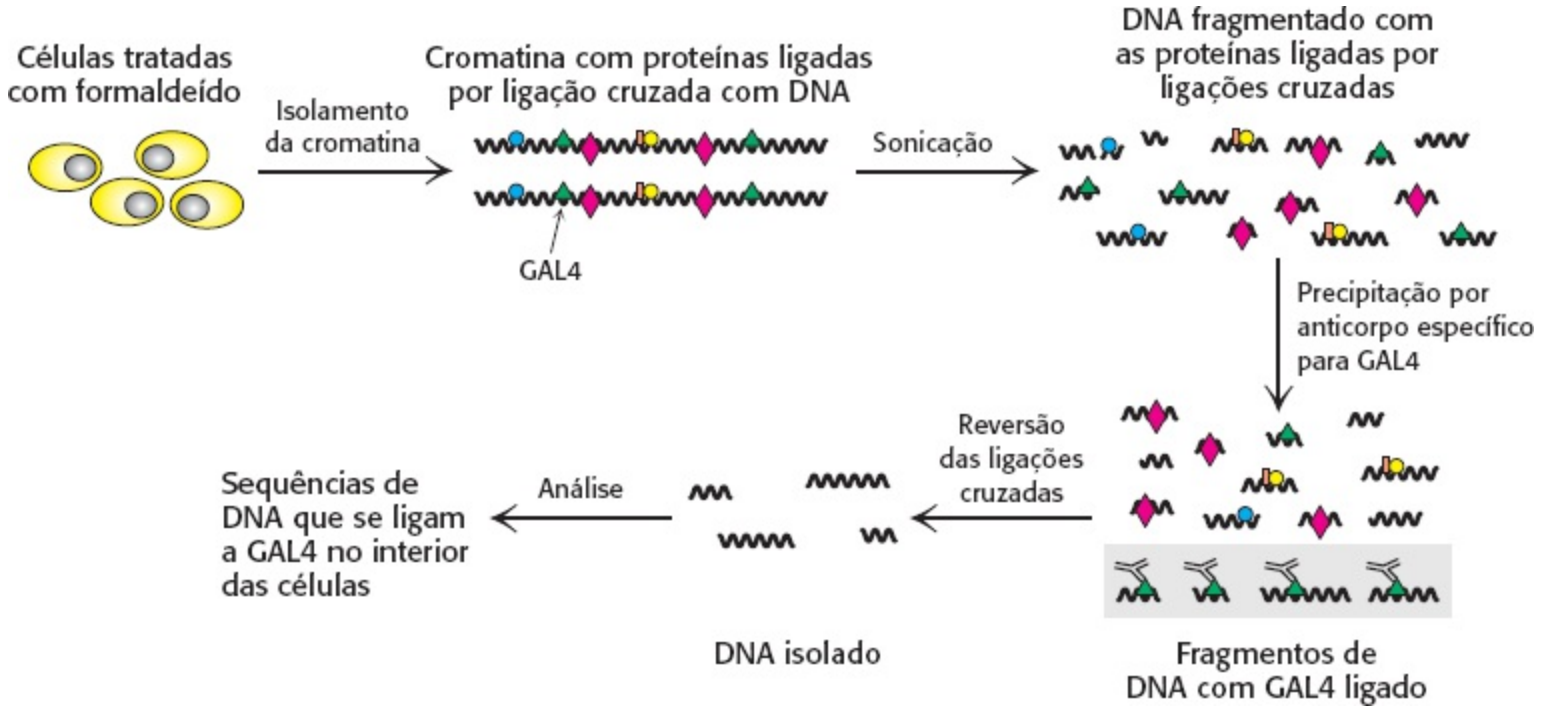
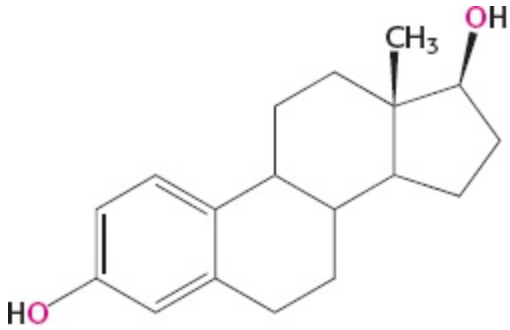


Figura 32.14 Imunoprecipitação da cromatina. Células ou núcleos isolados são tratados com formaldeído para formar ligações cruzadas entre as proteínas e o DNA. As células são, então, lisadas, e o DNA é fragmentado por sonicação. Fragmentos de DNA ligados a uma proteína específica são isolados graças ao uso de um anticorpo específico para esta proteína. As ligações cruzadas são, então, revertidas, e os fragmentos de DNA são caracterizados.

A distribuição das sequências CpG nos genomas de mamíferos não é uniforme. Muitas sequências CpG foram convertidas em TpG graças à mutação pela desaminação de 5-metilcitosina em timina; todavia, os sítios próximos às extremidades 5′ dos genes foram mantidas por causa de sua participação na expressão gênica. Assim sendo, a maioria dos genes é encontrada nas *ilhotas de CpG*, regiões no genoma que contêm aproximadamente quatro vezes mais sequências CpG do que o restante do genoma.

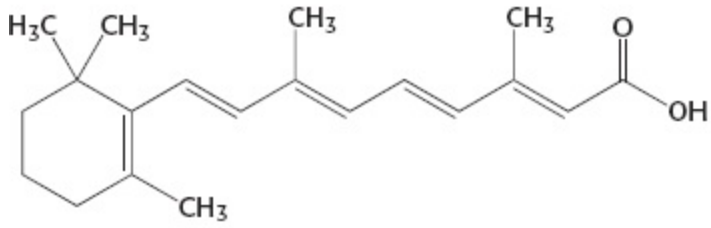
Esteroides e moléculas hidrofóbicas correlatas atravessam as membranas e se acoplam a receptores que se ligam ao DNA

A seguir, apresentaremos um exemplo que ilustra como os fatores de transcrição conseguem estimular alterações na estrutura da cromatina que influenciam a transcrição. Apresentaremos alguns detalhes do sistema que detecta e responde aos estrógenos. Sintetizados e liberados pelos ovários, os *estrógenos*, como o estradiol, são hormônios esteroides derivados do colesterol (Seção 26.4). Os estrógenos são necessários para o desenvolvimento das características sexuais femininas secundárias e, junto com a progesterona, participam do ciclo ovariano.

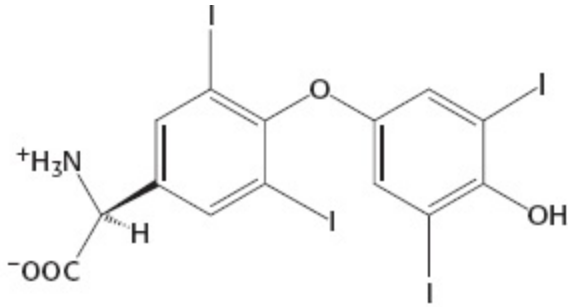


Estradiol
(um estrógeno)

Como os estrógenos são moléculas hidrofóbicas, eles se difundem com facilidade através das membranas celulares. Uma vez no interior das células, os estrógenos se ligam a proteínas (receptores) solúveis extremamente específicos. Os receptores de estrógenos pertencem a uma grande família de proteínas que atuam como receptores para uma ampla gama de moléculas hidrofóbicas, inclusive outros hormônios esteroides, hormônios tireóideos e retinoides.



Ácido *all-trans*-retinoico
(um retinoide)



Tiroxina
(L-3,5,3′,5′ -tetraiodotironina)
(um hormônio tireóideo)

O genoma humano codifica aproximadamente 50 membros dessa família, frequentemente denominados *receptores nucleares de hormônio*. Os genomas de outros eucariotos multicelulares codificam números semelhantes de receptores nucleares de hormônio, embora eles não existam nas leveduras.

Todos esses receptores apresentam um modo de ação semelhante. Ao se acoplar à molécula sinalizadora (denominada genericamente *ligante*), o complexo ligante-receptor modifica a expressão de genes específicos conectando-se a elementos controladores no DNA. Os receptores de estrógenos ligam-se a sítios específicos do DNA (denominados *elementos de resposta aos estrógenos* ou ERE) que contêm a sequência de consenso 5′-**AGGTCA**NNNTGACCT-3′. Como é esperado em decorrência da simetria dessa sequência, um receptor de estrógeno se acopla a esses sítios na forma de um dímero.

Uma comparação das sequências de aminoácidos dos membros dessa família revela dois domínios extremamente conservados: um domínio de ligação com o DNA e um domínio de acoplamento ao ligante (Figura 32.15). O domínio de ligação com o DNA está localizado próximo ao centro da molécula e consiste em um conjunto de domínios a base de zinco diferentes das proteínas do tipo *zinc-finger* Cys_2His_2 apresentadas na Seção 32.2. Esses domínios à base de zinco se acoplam a sequências específicas do DNA por meio de uma α-hélice que está situada no sulco maior nos complexos de DNA específicos formados pelos receptores de estrógenos.

Receptores nucleares de hormônio regulam a transcrição por recrutamento de coativadores para o complexo de transcrição

O segundo domínio extremamente conservado das proteínas receptoras nucleares está localizado próximo à terminação carboxila e é o sítio de acoplamento ao ligante. Esse domínio se "dobra" em uma estrutura constituída quase totalmente por α-hélices dispostas em três camadas. O ligante se acopla em um bolsão hidrofóbico localizado no centro desse arranjo de hélices (Figura 32.16). Esse domínio altera a conformação quando se une a seu ligante, estrógeno. Como a união ao ligante promove alterações na expressão gênica? O modelo mais simples teria a união do ligante alterando as propriedades de ligação com o DNA do receptor, de modo análogo ao que ocorre no repressor *lac* nos procariotos. Todavia, experimentos com receptores nucleares de hormônio purificados revelaram que a união ao ligante *não* modifica significativamente a afinidade e a especificidade da ligação com o DNA. Outro mecanismo é operacional.

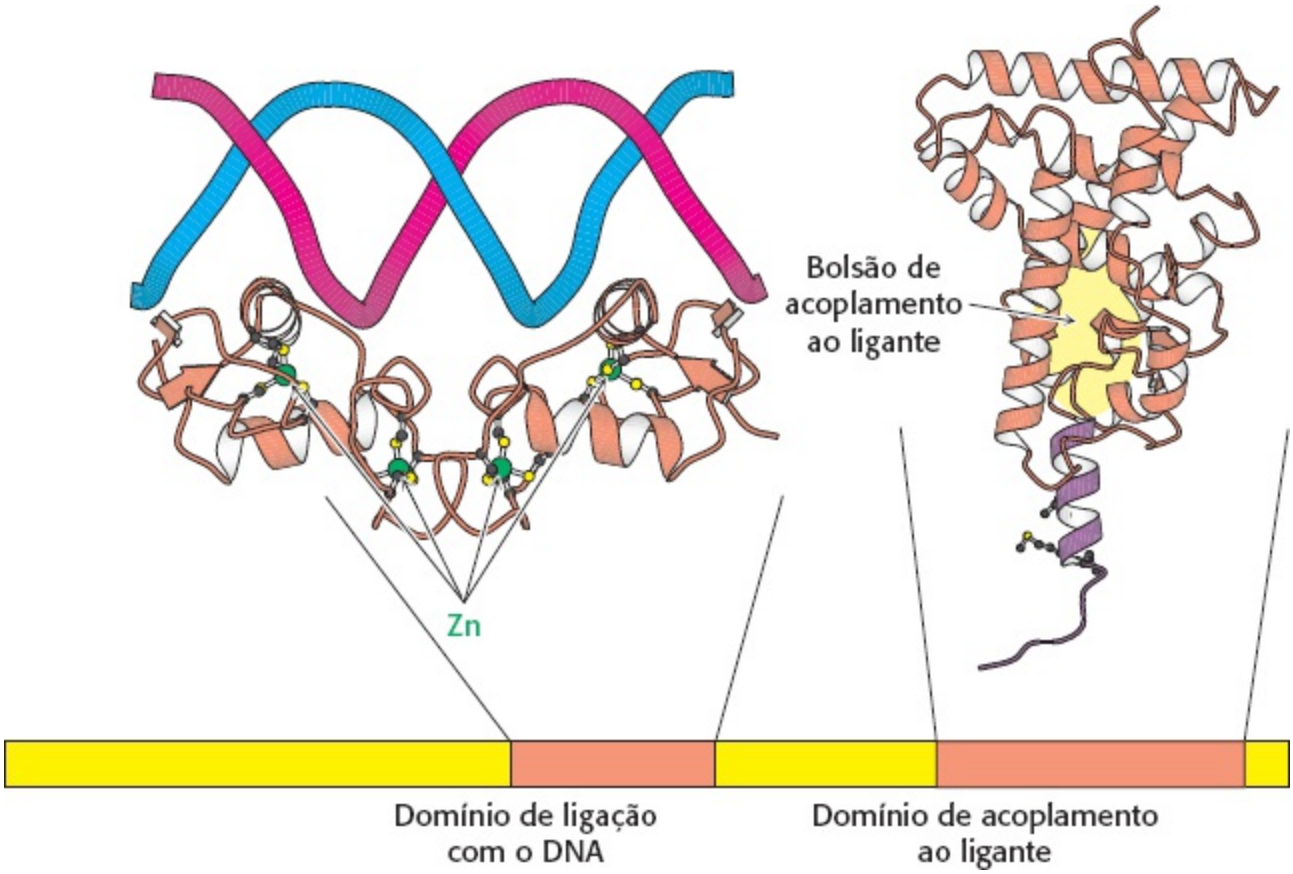


Figura 32.15 Estrutura de dois domínios de receptor nuclear de hormônio. Os receptores nucleares de hormônio contêm dois domínios cruciais conservados: (1) um domínio de ligação com o DNA próximo ao centro da sequência e (2) um domínio de acoplamento ao ligante próximo à terminação carboxila. A estrutura de um dímero do domínio de ligação com o DNA acoplado ao DNA é mostrada, assim como um monômero do domínio de acoplamento ao ligante normalmente dimérico. [Desenhada a partir de 1HCQ e 1LBD.pdb.]

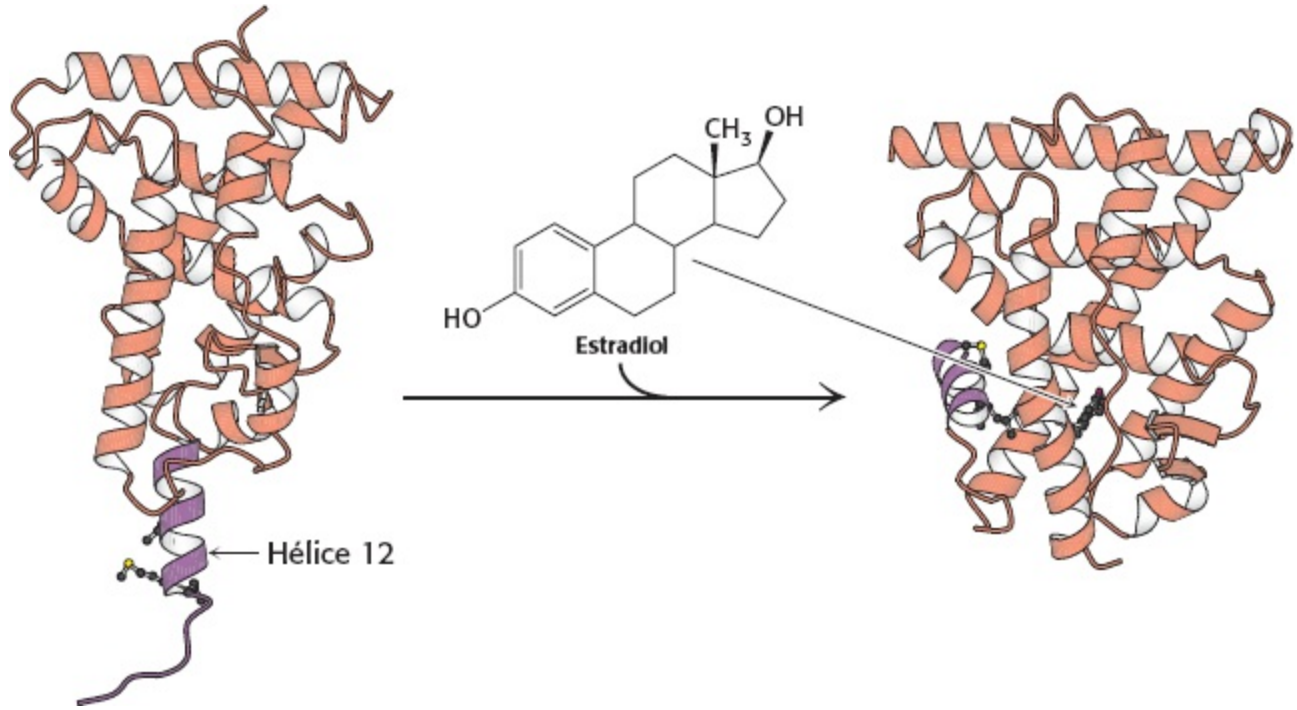


Figura 32.16 Acoplamento do ligante ao receptor nuclear de hormônio. O ligante está completamente circundado em um bolsão no domínio de acoplamento ao ligante. Observe que a última α-hélice, a hélice 12 (mostrada em roxo), está "dobrada" em um sulco na lateral da estrutura após o acoplamento do ligante. [Desenhada a partir de 1IDB e 1ERE.pdb.]

Visto que o acoplamento ao ligante não adultera a capacidade dos receptores nucleares de hormônio de se unirem ao DNA, os pesquisadores procuraram determinar se proteínas específicas poderiam se ligar aos receptores nucleares de hormônio apenas na presença do ligante. Essas pesquisas resultaram na identificação de várias proteínas correlatas denominadas *coativadores*, como o coativador do receptor de esteroide 1 (SRC-1, *do inglês steroid receptor coactivator-1*), proteína de interação com receptor de glicocorticoide 1 (GRIP-1, *do inglês glucocorticoid receptor interacting protein-1*) e coativador de receptor nuclear de hormônio 1 (NcoA-1, *do inglês nuclear hormone receptor coactivator-1*). Esses coativadores são classificados na família p160 por causa de seu tamanho. A união do ligante ao receptor induz uma modificação conformacional que possibilita o recrutamento de um coativador (Figura 32.17). Em muitos casos, esses coativadores são enzimas que catalisam reações que resultam na modificação da estrutura da cromatina.

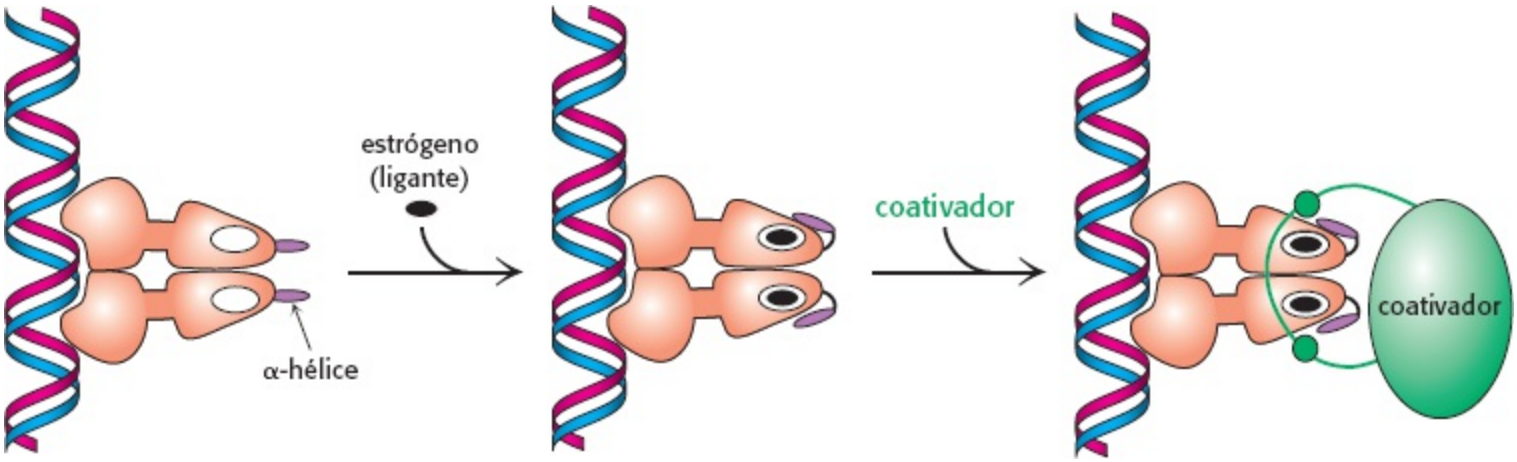
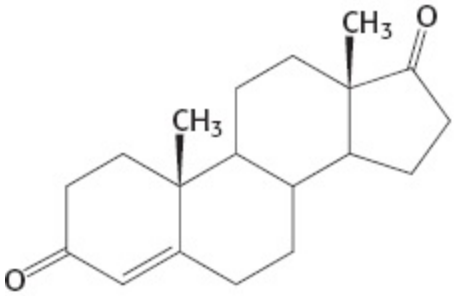


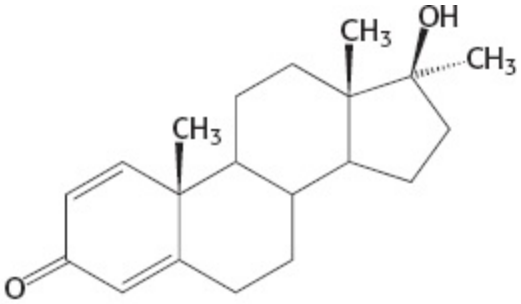
Figura 32.17 Recrutamento do coativador. A união do ligante com um receptor nuclear de hormônio induz uma alteração conformacional no domínio de acoplamento ao ligante. Essa alteração da estrutura tridimensional gera sítios favoráveis à ligação de um coativador.

Receptores de hormônios esteroides são alvos para medicamentos

Moléculas como o estradiol que se ligam a um receptor e desencadeiam vias de sinalização são denominadas *agonistas*. Os atletas são, às vezes, usuários de agonistas naturais e sintéticos do receptor de androgênios, um membro da família dos receptores nucleares de hormônio, porque a ligação desses agonistas ao receptor de androgênio estimula a expressão de genes que estimulam o crescimento da massa muscular magra.



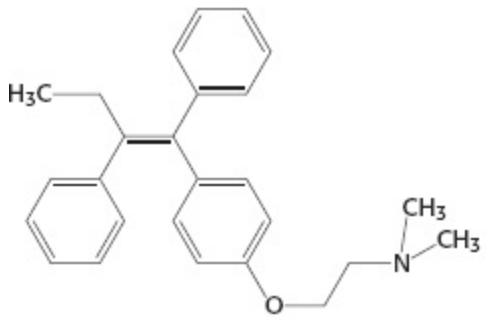
Androstenediona
(androgênio natural)



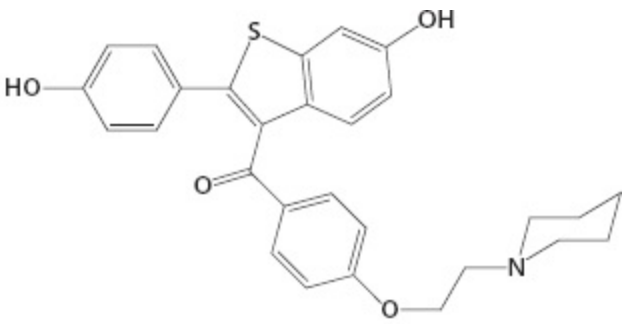
Dianabol
(metandrostenolona)
(androgênio sintético)

Esses compostos, também denominados *esteroides anabólicos*, quando usados de forma exagerada provocam efeitos colaterais. Nos homens, o uso excessivo resulta em redução da secreção de testosterona, atrofia testicular e, algumas vezes, aumento das mamas (ginecomastia) se parte do androgênio excessivo for convertido em estrógeno. Nas mulheres o excesso de testosterona provoca redução da ovulação e da secreção de estrógeno, além de redução das mamas e crescimento de pelos faciais.

Outras moléculas se acoplam aos receptores nucleares de hormônio, contudo, não deflagram efetivamente as vias sinalizadoras. Esses compostos são denominados *antagonistas* e são, de muitas formas, semelhantes aos inibidores competitivos de enzimas. Alguns medicamentos importantes são antagonistas direcionados para o receptor de estrógeno. O *tamoxifeno* e o *raloxifeno*, por exemplo, são prescritos para o tratamento e a prevenção de câncer de mama porque alguns tumores mamários dependem de vias mediadas por estrógeno para seu crescimento. Visto que alguns desses compostos exercem efeitos distintos em diferentes formas do receptor de estrógeno, são descritos como moduladores seletivos do receptor de estrógeno (MSRE).



Tamoxifeno



Raloxifeno

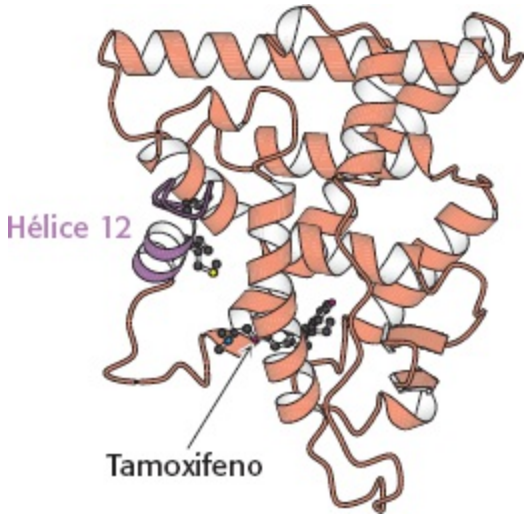


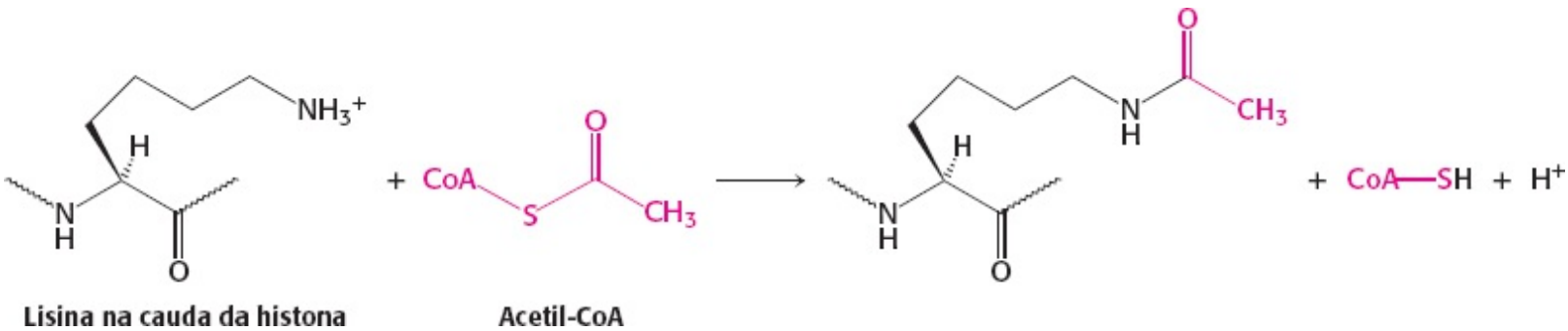
Figura 32.18 Complexo tamoxifeno-receptor de estrógeno. O tamoxifeno conecta-se ao bolsão normalmente ocupado por estrógenos. Todavia, observe que parte da estrutura do tamoxifeno se projeta para fora do bolsão e, por causa disso, a hélice 12 não consegue se compactar em sua posição habitual. Em vez disso, a hélice 12 bloqueia o sítio de ligação com o coativador. [Desenhada a partir de 3ERT.pdb.]

A determinação das estruturas dos complexos formados pelo receptor de estrógeno e esses medicamentos revelou o fundamento de seu efeito antagonista (Figura 32.18). O tamoxifeno liga-se ao mesmo sítio que o estradiol. Porém o tamoxifeno apresenta um grupo que se estende para fora do bolsão normal de acoplamento ao ligante, assim como outros antagonistas. Esses grupos bloqueiam as alterações normais da estrutura tridimensional induzidas pelo estrógeno. O tamoxifeno bloqueia a conexão dos coativadores e, assim, inibe a ativação da expressão gênica.

A estrutura da cromatina é modulada por modificações covalentes das caudas de histona

Já vimos que os receptores nucleares reagem a moléculas sinalizadoras por meio do recrutamento de coativadores. Agora podemos questionar como os coativadores modulam a atividade transcricional. *Essas proteínas "afrouxam" a ligação do complexo histona com o DNA, expondo regiões adicionais dele para o maquinário de transcrição*.

Boa parte da efetividade dos coativadores parece resultar de sua capacidade de modificar covalentemente as caudas aminoterminais das histonas, assim como regiões em outras histonas. Alguns dos coativadores p160 e as proteínas por eles recrutadas catalisam a transferência de grupos acetila da acetil-CoA para resíduos de lisina específicos nessas caudas aminoterminais.



As enzimas que catalisam essas reações são denominadas *histona acetiltransferases* (HAT). As caudas das histonas são facilmente estendidas, portanto, conseguem se encaixar no sítio ativo da HAT e serem acetiladas (Figura 32.19).

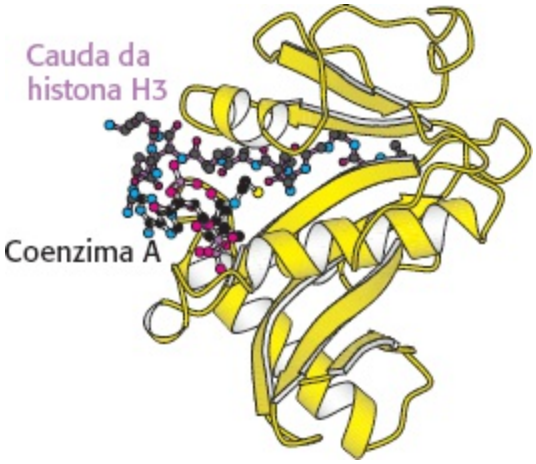


Figura 32.19 Estrutura da histona acetiltransferase. A cauda aminoterminal da histona H3 estende-se para um bolsão no qual uma cadeia lateral da lisina consegue aceitar um grupo acetila da acetil-CoA ligada em um sítio adjacente [Desenhada a partir de 1QSN.pdb.]

Quais são as consequências da acetilação das histonas? A lisina tem um grupo amônio com carga elétrica positiva em pH neutro. O acréscimo de um grupo acetila gera um grupo amida sem carga elétrica. Essa alteração reduz substancialmente a afinidade da cauda pelo DNA e reduz discretamente a afinidade do complexo histona pelo DNA, "afrouxando" assim a conexão entre o complexo histona e o DNA.

Além disso, os resíduos de lisina acetilados interagem com um *domínio de ligação com acetil-lisina* que é encontrado em muitas proteínas que regulam a transcrição em eucariotos. Esse domínio, denominado *bromodomínio*, é constituído por aproximadamente 110 aminoácidos que formam um feixe com quatro hélices contendo um sítio de ligação a um peptídio em uma extremidade (Figura 32.20).

Figura 32.20 Estrutura de um bromodomínio. Esse domínio com um feixe de quatro hélices conecta-se a peptídios contendo acetillisina. Observe que um peptídio acetilado da histona H4 está acoplado à estrutura. [Desenhada a partir de 1EGl.pdb.]

As proteínas contendo bromodomínios são componentes de dois grandes complexos essenciais à transcrição. Um desses dois complexos tem mais de 10 polipeptídios e se acopla a *proteína de ligação à caixa TATA (TATA box)*. É preciso lembrar que a proteína de ligação à caixa TATA é um fator de transcrição essencial para muitos genes (Seção 29.2). As proteínas que se conectam à proteína de ligação à caixa TATA são denominadas fatores associados à proteína de ligação TATA (TAF, *do inglês TATA-box-binding protein associated factors*). TAF1, em especial, contém um par de bromodomínios perto de sua terminação carboxila. Os dois domínios estão orientados de forma que cada um se liga a um de dois resíduos acetil-lisina nas posições 5 e 12 na cauda da histona H4. *Assim, a acetilação das caudas de histona constitui um mecanismo de recrutamento de outros componentes do maquinário transcricional*.

Os bromodomínios também são encontrados em alguns componentes de grandes complexos conhecidos como *complexos de remodelagem de cromatina* ou *maquinário de remodelagem da cromatina*. Esses complexos, que também contêm domínios homólogos aos das helicases, utilizam a energia livre da hidrólise de ATP para desviar as posições de nucleossomas ao longo do DNA e para induzir outras alterações conformacionais na cromatina (Figura 32.21). A acetilação da histona pode resultar em reorganização da estrutura da cromatina, potencialmente expondo sítios de ligação para outros fatores. *Portanto, a acetilação da histona pode ativar a transcrição por meio de uma combinação de três mecanismos: redução da afinidade das histonas pelo DNA, recrutamento de outros componentes do maquinário transcricional e iniciação da remodelagem da estrutura da cromatina*.

Os receptores nucleares de hormônio também incluem regiões que interagem com componentes do complexo mediador. Assim sendo, dois mecanismos de regulação gênica conseguem atuar juntos. A modificação das histonas e a remodelagem da cromatina conseguem abrir regiões da cromatina nas quais o complexo de transcrição consegue ser recrutado por meio de interações entre proteínas.

Histonas desacetilase contribuem para a repressão transcricional

Como nos procariotos, algumas alterações no ambiente de uma célula resultam em repressão de genes que estavam ativos. A modificação das caudas das histonas mais uma vez tem um papel importante. Todavia, na repressão, uma reação crucial parece ser a desacetilação da lisina acetilada, catalisada por enzimas específicas, as *histona desacetilases*.

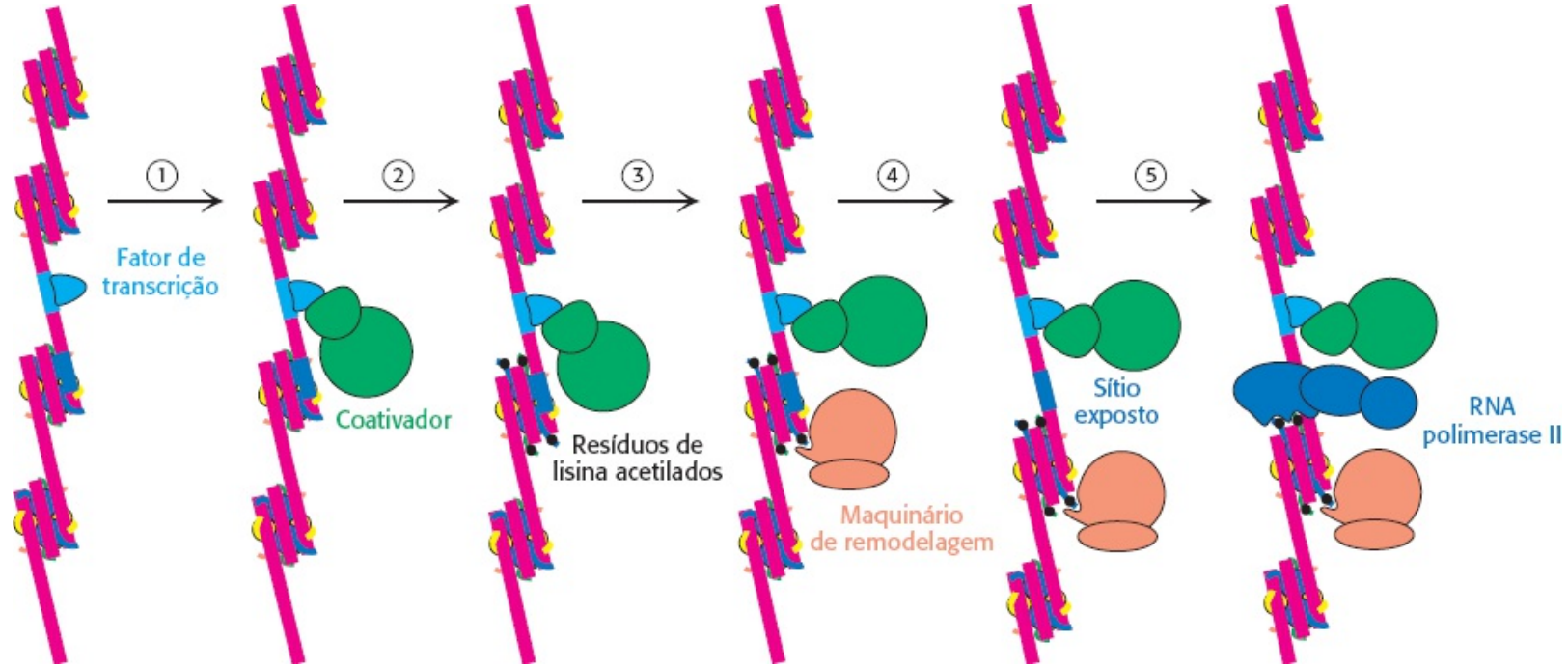


Figura 32.21 Remodelagem da cromatina. A regulação gênica nos eucariotos começa com um fator de transcrição ativado e ligado a um sítio específico no DNA. Um esquema para a iniciação da transcrição pela RNA polimerase II exige cinco etapas: (1) recrutamento de um coativador, (2) acetilação de resíduos lisina nas caudas da histona, (3) acoplamento de um complexo de maquinário de remodelagem aos resíduos lisina acetilados, (4) remodelagem ATP-dependente da estrutura da cromatina para expor um sítio de ligação para a RNA polimerase ou para outros fatores e (5) recrutamento de RNA polimerase. Apenas duas subunidades são mostradas para cada complexo, embora os complexos verdadeiros sejam bem maiores. Outros esquemas também são possíveis.

De muitas formas, a acetilação e a desacetilação de resíduos de lisina nas caudas de histona (e, provavelmente, em outras proteínas) são análogas a fosforilação e à desfosforilação dos resíduos de serina, treonina e tirosina em outros estágios dos processos de sinalização. Como o acréscimo de grupos fosforila, o acréscimo de grupos acetila consegue induzir alterações conformacionais e gerar novos sítios de ligação. Não obstante, se não houver um meio de remover esses grupos, essas trocas de sinalização ficarão "presas" em uma posição e perderão sua efetividade. Como as fosfatases, as desacetilases ajudam a reprogramar as trocas.

Tabela 32.2 Algumas modificações de histona.

Modificação	Associada a
H4 K8, acetilação	Ativação
H3 K14, acetilação	Ativação
H3 K27, monometilação	Ativação
H3 K27, trimetilação	Repressão
H3 R17, metilação	Ativação
H2B S14, fosforilação	Reparo de DNA
H2B K120, ubiquitinação	Ativação

A acetilação não é a única modificação das histonas e de outras proteínas nos processos de regulação gênica. A metilação de resíduos de lisina e arginina específicos também pode ser importante. Algumas das modificação mais frequentes são mostradas na Tabela 32.2. A elucidação da participação desses processos é uma área de pesquisa muito ativa atualmente. A correlação entre as várias modificações da histona e seus papéis no controle da expressão gênica expressão gênica é, às vezes, denominada o "código da histona". Embora já tenha havido descobertas importantes e generalizações, esse código é obviamente sutil e complicado, e não apenas um conjunto de regras fáceis e básicas.

32.4 A expressão gênica eucariótica pode ser controlada em níveis pós-transcricionais

Como nos procariotos, a expressão gênica nos eucariotos pode ser regulada após a transcrição. Consideremos dois exemplos. O primeiro é a regulação de genes que participam no metabolismo do ferro graças a características especiais na estrutura secundária do RNA, de uma maneira muito semelhante à regulação pós-transcricional nos procariotos (Seção 31.4). O segundo exemplo envolve um mecanismo totalmente novo, vislumbrado inicialmente com a descoberta do RNA de interferência (p. 167). Determinadas moléculas pequenas de RNA reguladoras possibilitam a regulação da expressão gênica por meio de interação com uma gama de moléculas de mRNA. Esse mecanismo, descoberto recentemente, influencia a expressão de aproximadamente 60% de todos os genes humanos.

Genes associados ao metabolismo do ferro são regulados traducionalmente em animais

A estrutura secundária do RNA participa na regulação do metabolismo do ferro nos eucariotos. O ferro é um nutriente essencial, necessário para a síntese de hemoglobina, citocromos e muitas outras proteínas. Todavia, o excesso de ferro também pode ser muito deletério porque, se não for controlado por proteínas adequadas, o ferro pode desencadear inúmeras reações de radicais livres que são lesivas para as proteínas, os lipídios e os aminoácidos. Os animais evoluíram sistemas sofisticados para armazenar ferro em períodos de escassez e para o armazenamento seguro do excesso de ferro para uso posterior. As proteínas fundamentais incluem *transferrina*, uma proteína de transporte que carreia o ferro no soro, o *receptor de transferrina*, uma proteína de membrana que se liga a transferrina acoplada ao ferro e inicia o seu transporte para dentro da célula, e a *ferritina*, uma proteína de armazenamento de ferro extraordinariamente eficiente que é encontrada basicamente no fígado e nos rins. Os 24 polipeptídios da ferritina formam um envoltório quase esférico que engloba até 2.400 átomos de ferro, na razão de um átomo de ferro por aminoácido (Figura 32.22).

Os níveis de expressão de ferritina e de receptor de transferrina apresentam relação recíproca em suas respostas às alterações dos níveis de ferro. Nos casos de escassez de ferro, o nível de receptor de transferrina aumenta e pouca ou nenhuma ferritina é sintetizada. É interessante mencionar que a síntese de mRNA dessas proteínas não se modifica de acordo com essas alterações. Na verdade, a regulação ocorre no nível da tradução.

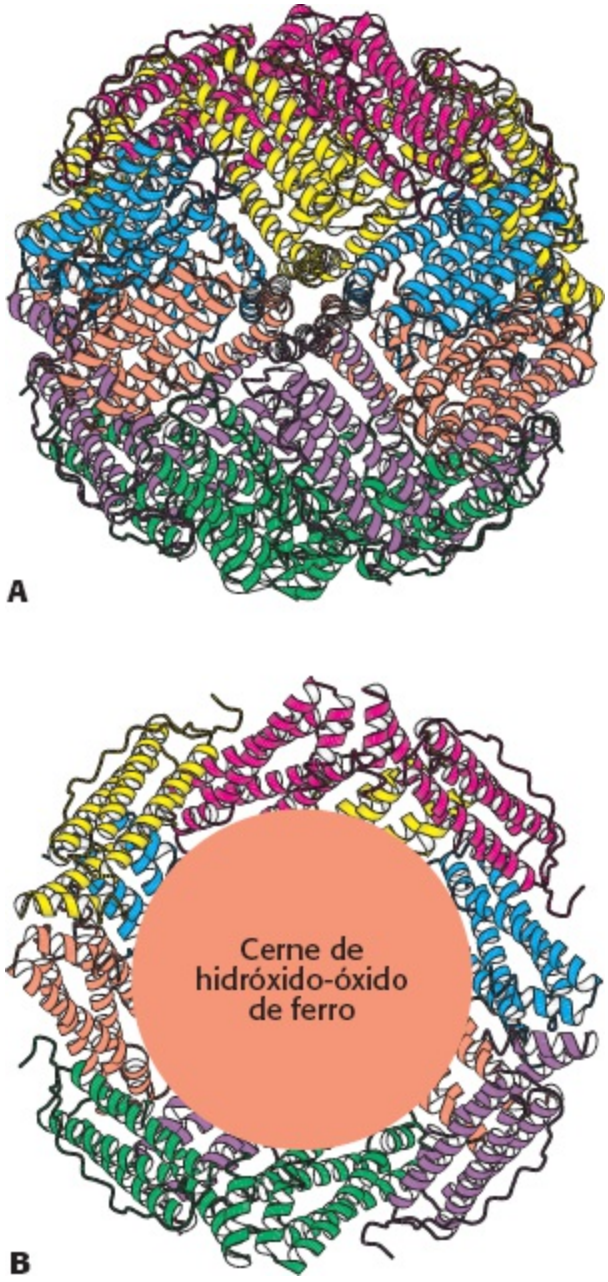


Figura 32.22 Estrutura da ferritina. A. 24 polipeptídios de ferritina formam um envoltório quase esférico. **B**. Um corte revela o cerne onde é armazenado ferro na forma de um complexo de hidróxido-óxido de ferro. [Desenhada a partir de 1IES.pdb.]

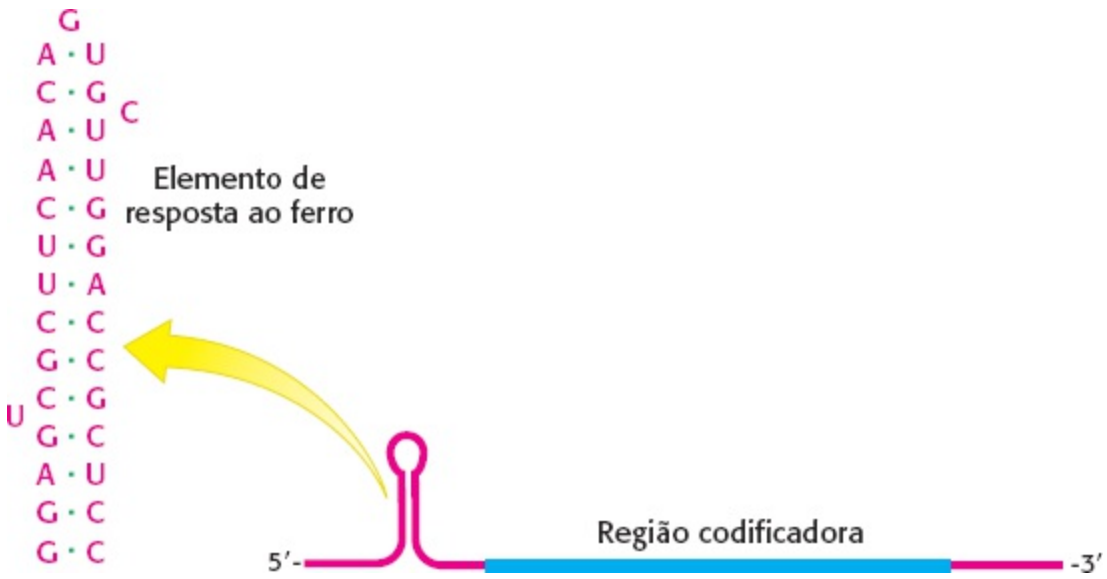


Figura 32.23 Elemento de resposta ao ferro. O mRNA para a ferritina inclui uma estrutura em haste-alça denominada

elemento de resposta ao ferro (IRE) na região 5′ não traduzida. O IRE liga-se a uma proteína específica que bloqueia a tradução desse mRNA em condições de baixas concentrações de ferro.

Considere primeiro a ferritina. O mRNA da ferritina inclui uma estrutura em haste-alça denominada *elemento de resposta ao ferro* (IRE, do inglês *iron response element*) em sua região 5′ não traduzida (Figura 32.23). Essa estrutura em haste-alça se acopla a uma proteína de 90 kDa – a *proteína ligante de IRE* (IRP) que bloqueia a iniciação da tradução quando o IRE se liga ao lado 5′ da região codificadora. Quando o nível de ferro aumenta, a IRP se liga ao ferro na forma de *cluster* 4Fe-4S. A IRP ligada ao ferro não consegue se acoplar ao RNA porque os sítios de ligação para o ferro e para o RNA apresenta significativa superposição. Portanto, quando há ferro, o mRNA da ferritina é liberada da IRP e traduzida para produzir ferritina, que sequestra o excesso de ferro.

Um exame da sequência nucleotídica do mRNA do receptor de transferrina revela a existência de várias regiões IRE-símiles. Todavia, essas regiões estão localizadas na região 3 não traduzida em vez de na região 5 não traduzida (Figura 32.24). Em condições de baixa concentração de ferro, a IRP acopla-se a esses IRE. Tendo em vista a localização desses sítios de ligação, o mRNA do receptor de transferrina ainda pode ser traduzido. O que acontece quando o nível de ferro aumenta e a IRP não se liga mais ao mRNA do receptor de transferrina? Libertado da IRP o mRNA do receptor de transferrina é rapidamente degradado. A elevação do nível celular do ferro resulta em destruição do mRNA do receptor de transferrina e, consequentemente, na redução da produção da proteína, receptor de transferrina.

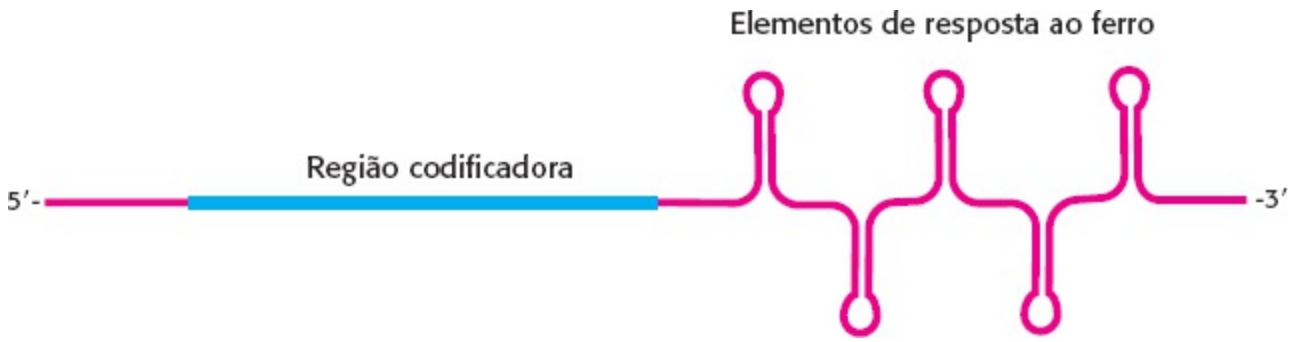


Figura 32.24 mRNA do receptor de transferrina. Esse mRNA tem um conjunto de elementos de resposta ao ferro (IRE) em sua região 3′ não traduzida. O acoplamento da proteína ligante de IRE a esses elementos estabiliza o mRNA, mas não interfere na tradução.

A purificação da IRP e a clonagem de seu cDNA elucidaram várias questões relacionadas com a evolução. Constatou-se que a IRP apresenta aproximadamente 30% de semelhança, em termos de sequência de aminoácidos, com a enzima aconitase mitocondrial (do ciclo do ácido cítrico) (p. 515). Análise posterior revelou que a IRP é, na verdade, uma enzima aconitase ativa. Trata-se de uma aconitase citoplasmática conhecida há muito tempo, mas cuja função não era bem compreendida (Figura 32.25). O centro de ferro e enxofre no sítio ativo da IRP é um pouco instável, e a perda do ferro desencadeia alterações significativas na conformação da proteína. Por conseguinte, essa proteína pode atuar como fator de detecção de ferro.

Outros mRNA, inclusive aqueles que participam na síntese do heme, contêm IRE. Assim sendo, os genes codificadores de proteínas necessários para o metabolismo do ferro adquiriram sequências, que, quando transcritas, propiciaram sítios de ligação para a proteína detectora de ferro. Um sinal ambiental – a concentração de ferro – controla a tradução de proteínas necessárias para o

metabolismo desse metal. As mutações na região não traduzida dos mRNA foram selecionadas para a regulação benéfica por níveis de ferro.

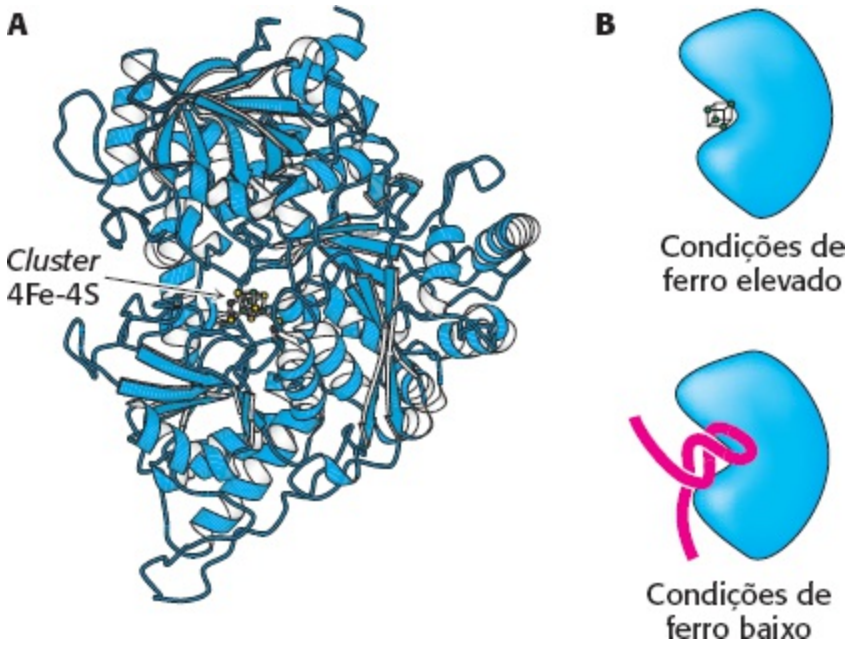


Figura 32.25 IRP é uma aconitase. A Aconitase contém um *cluster* 4Fe-4S instável em seu centro. **B**. Em condições de ferro baixo, o *cluster* 4Fe-4S se dissocia e moléculas apropriadas de RNA conseguem se ligar em seu lugar. [Desenhada a partir de 1C96.pdb.]

Pequenos RNA regulam a expressão de muitos genes eucarióticos

Estudos genéticos do desenvolvimento em C. *elegans* revelaram que um gene denominado *lin-4* codifica uma molécula de RNA com 61 nucleotídios de comprimento que consegue regular a expressão específica de outros genes. O RNA de *lin-4* com 61 nucleotídios não codifica uma proteína; contudo, é clivado em um RNA de 22 nucleotídios que possui atividade reguladora. Essa descoberta foi o primeiro vislumbre de uma grande classe de RNA reguladores que agora são designados *microRNA* ou *miRNA*. A chave para a atividade dos microRNA e sua especificidade por genes específicos é sua capacidade de formar complexos estabilizados (pares de bases) de Watson-Crick com os mRNA desses genes.

Esses miRNA não atuam sozinhos. Na verdade, o miRNA se liga a membros de uma classe de proteínas denominada família *Argonauta* (Figura 32.26). Esses complexos Argonauta-miRNA conseguem, então, acoplar-se aos mRNA que têm sequências que são substancialmente complementares aos miRNA. Uma vez ligado, esse mRNA pode ser clivado pelo complexo Argonauta-miRNA graças à ação de um sítio ativo à base de magnésio. Assim sendo, *os miRNA atuam como RNA-guias que determinam a especificidade do complexo Argonauta* (Figura 32.27). A clivagem do mRNA pelo complexo Argonauta-miRNA é semelhante ao mecanismo do RNA de interferência (p. 167). As pequenas moléculas de RNA que participam no RNAi, entretanto, provêm de um local diferente. No RNAi, os RNA de fitas duplas são clivados em fragmentos com 21 nucleotídios, formando componentes de fita simples que são ligados por membros da família Argonauta para formar um complexo RISC que cliva mRNA complementares. Para os miRNA, os RNA de fita simples são gerados a partir de precursores maiores codificados geneticamente, como foi descrito no Capítulo 28.

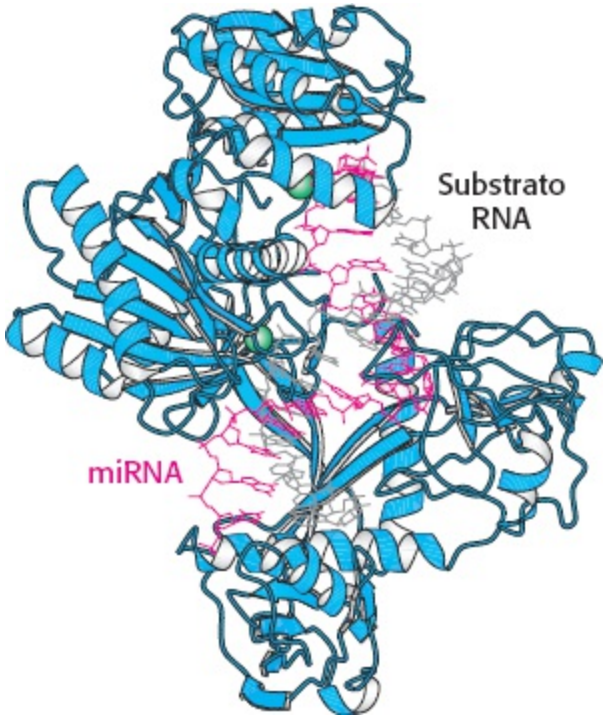


Figura 32.26 Complexo microRNA-Argonauta. O miRNA (mostrado em vermelho) está ligada pela proteína Argonauta. *Observe* que o miRNA atua como um guia que se liga ao substrato RNA (mostrado em cinza) graças à formação de uma dupla-hélice. Dois íons magnésio são mostrados em verde. [Desenhada a partir de 3HK2.pdb.]

Acreditou-se inicialmente que a ocorrência de regulação gênica pelos miRNA se limitasse a um número relativamente pequeno de espécies. Todavia, estudos subsequentes revelaram que esse modo de regulação gênica é quase onipresente em eucariotos. Na verdade, já foram identificados mais de 700 miRNA codificados pelo genoma humano. Cada miRNA consegue regular muitos genes diferentes porque existem muitas sequências-alvo diferentes em cada mRNA. Estima-se que 60% de todos os genes humanos sejam regulados por um ou mais miRNA. Como exemplo, considere o miRNA humano denominado miR-206. Esse miRNA infrarregula a expressão de uma isoforma do receptor de estrógeno. Além disso, esse miRNA parece infrarregular a expressão de vários coativadores diferentes que interagem com o receptor de estrógeno. Portanto, esse miRNA consegue desativar a influência do estrógeno por meio do bloqueio da via de sinalização iniciada pelo estrógeno em diversas etapas.

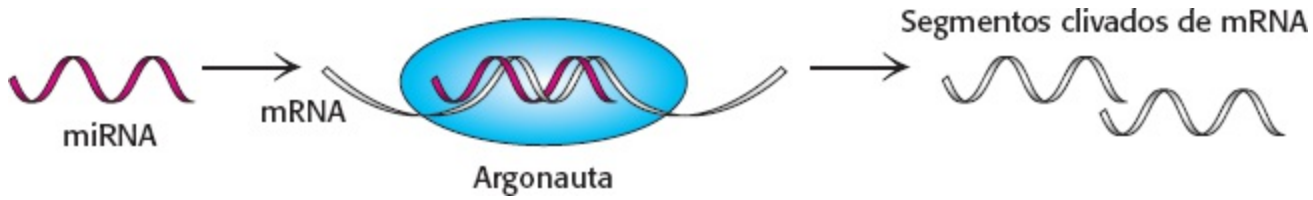


Figura 32.27 Ação do microRNA. MicroRNA ligam-se a membros da família Argonauta e direcionam a clivagem de moléculas específicas de mRNA.

A via dos microRNA tem repercussões substanciais na evolução das vias de regulação gênica. A maioria dos sítios-alvo do miRNA é encontrada nas regiões 3′ não traduzidas dos mRNA. Essas sequências são muito livres para sofrer mutação porque não codificam proteínas e não precisam se dobrar em estruturas específicas. Assim sendo, no contexto de um conjunto de mRNA expressos, as mutações nessa região de qualquer gene poderia, em princípio, aumentar ou diminuir a

afinidade de um ou mais miRMNA e modificar a regulação do gene.

Resumo

32.1 DNA eucariótico é organizado em cromatina

O DNA eucariótico está firmemente ligado a proteínas básicas denominadas histonas; a combinação é denominada cromatina. O DNA enrola-se duas vezes em torno de um octâmero de histonas centrais e forma um nucleossoma. As quatro histonas centrais são homólogas e dobram-se em estruturas semelhantes. Cada histona central tem uma cauda aminoterminal rica em resíduos de lisina e arginina. Os nucleossomas são o primeiro estágio de compactação do DNA eucariótico. A cromatina bloqueia o acesso a muitos locais de potenciais ligações com o DNA. As alterações na estrutura da cromatina são importantes na regulação da expressão gênica.

32.2 Fatores de transcrição ligam-se ao DNA e regulam o início da transcrição

A maioria dos genes eucarióticos não são expressos a menos que sejam ativados pela ligação de proteínas específicas, denominadas fatores de transcrição, com sítios no DNA. Essas proteínas específicas de ligação com o DNA interagem direta ou indiretamente com RNA polimerases ou suas proteínas associadas. Os fatores de transcrição eucarióticos são modulares: consistem em domínios de ativação e domínios de ligação com DNA separados. Classes importantes de proteínas de ligação com o DNA incluem os homeodomínios, as proteínas com zíper de leucina básica e proteínas do tipo *zinc-finger* Cys_2His_2. Cada uma dessas classes de proteínas utiliza uma α-hélice para estabelecer contatos específicos com o DNA. Os domínios de ativação interagem com RNA polimerases ou seus fatores associados, ou com outros complexos proteicos como mediadores. Amplificadores (*enhancers*) são elementos do DNA que conseguem modular a expressão gênica de uma distância superior a 1.000 pb do sítio de iniciação da transcrição. Os amplificadores são, com frequência, específicos para determinados tipos de células, dependendo de quais proteínas de ligação com o DNA estão presentes. A introdução de genes para um conjunto específico de quatro fatores de transcrição em fibroblastos pôde fazer com que essas células se desdiferenciem em células-tronco pluripotentes induzidas.

32.3 O controle da expressão gênica pode exigir remodelagem da cromatina

A estrutura da cromatina é indispensável para o controle da expressão gênica. A estrutura da cromatina é mais aberta próximo aos sítios de iniciação da transcrição de genes ativamente transcritos. Esteroides como os estrógenos se ligam a fatores de transcrição eucariótica denominados receptores nucleares de hormônios. Essas proteínas têm a capacidade de se ligar ao DNA, independentemente de haver ou não ligantes acoplados. O acoplamento dos ligantes induz uma modificação conformacional que possibilita o recrutamento de outras proteínas denominadas coativadoras. Entre as funções mais importantes das proteínas coativadoras está a catalisação do acréscimo de grupos acetila a resíduos de lisina nas caudas das proteínas histonas. A acetilação da histona reduz a afinidade das histonas pelo DNA, tornando genes adicionais disponíveis para a transcrição. Além disso, as histonas acetiladas são alvos de proteínas que contêm unidades específicas de ligação denominadas bromodomínios. Os

bromodomínios pertencem a duas classes de grandes complexos: (1) maquinário de remodelagem da cromatina e (2) fatores associados a RNA polimerase II. Esses complexos abrem sítios na cromatina e iniciam a transcrição.

32.4 A expressão gênica eucariótica pode ser controlada em níveis pós-transcricionais

Os genes codificadores de proteínas que transportam e armazenam ferro são regulados em nível traducional. Elementos de resposta ao ferro (IRE), estruturas existentes em determinados mRNA, são conectados por uma proteína ligante de IRE quando ela não está se conectando ao ferro. A estimulação ou a inibição da expressão de um gene em resposta a alterações no estado do ferro depende da localização da IRE no mRNA. A proteína ligante de IRE é uma aconitase citoplasmática que perde seu centro de ferro-enxofre em condições de níveis baixos de ferro. MicroRNA são moléculas de RNA especializadas que são codificadas como partes de precursores maiores de RNA. MicroRNA ligam-se a proteínas da família Argonauta. Os miRNA ligados atuam como guias que ajudam o acoplamento com moléculas de RNA específicas que depois são clivadas.

Palavras-chave

agonista (p. 954)
amplificador (*enhancer*) (p. 949)
antagonista (p. 954)
bromodomínio (p. 955)
célula-tronco pluripotente induzida (iPS) (p. 950)
coativador (p. 953)
complexo de remodelagem de cromatina (p. 956)
controle combinatorial (p. 949)
cromatina (p. 945)
domínio de ligação com acetil-lisina (p. 955)
domínio do tipo *zinc-finger* (dedo de zinco) Cys_2His_2 (p. 948)
elemento de resposta ao estrógeno (ERE) (p. 952)
elemento de resposta ao ferro (IRE) (p. 958)
esteroide anabólico (p. 954)
fator associado à proteína de ligação TATA (TAF) (p. 956)
fator de transcrição (p. 947)
ferritina (p. 957)
hipometilação (p. 951)
histona (p. 944)
histona acetiltransferase (HAT) (p. 955)
histona desacetilase (p. 956)
homeodomínio (p. 947)
ilhota CpG (p. 952)
imunoprecipitação de cromatina (ChIP) (p. 951)
mediador (p. 948)
microRNA (miRNA) (p. 959)
modulador seletivo de receptor de estrógeno (MSRE) (p. 954)

nucleossoma (p. 945)
partícula central do nucleossoma (p. 945)
proteína com zíper de leucina básica (bZip) (p. 948)
proteína ligante de IRE (IRP) (p. 958)
proteínas da família Argonauta (p. 959)
receptor de transferrina (p. 957)
receptor nuclear de hormônio (p. 952)
sítio hipersensível (p. 950)
tipo de célula (p. 944)
transferrina (p. 957)

Questões

1. *Neutralização da carga elétrica*. Tendo em vista as sequências de aminoácidos das histonas mostradas adiante, estime a carga elétrica de um octâmero de histona em pH = 7. Parta da suposição de que os resíduos histidina não apresentam carga elétrica neste pH. Como esta carga se compara com a carga elétrica nos 150 pares de bases de DNA?

HISTONA H2 A

MSGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYSERVGAGAPVYLAAVLEYLTAEILELAGNA

ARDNKKTRIIPRHLQLAIRNDEELNKLLGRVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTESHHKAKGK

HISTONA H2 B

MPEPAKSAPAPKKGSKKAVTKAQKKDGKKRKRSRKESYSVYVYKVLKQVHPDTGISSKAMGIMNSFVNDI

FERIAGEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK

HISTONA H3

MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPSTGGVKKPHRYRPGTVALREIRRYQKSTELLIRKLPFQR

LVREIAQDFKTDLRFQSAAIGALQEASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA

HISTONA H4

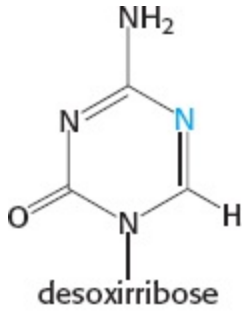
MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLIYEETRGVLKVFLENVIRDA

VTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG

2. *Imunoprecipitação de cromatina*. Você usou a técnica de imunoprecipitação de cromatina para isolar fragmentos de DNA contendo uma proteína de ligação com DNA específica. Suponha que você deseje saber se existe um determinado fragmento de DNA na mistura isolada. Como você poderia fazê-lo?

3. *E vamos nós*! Pressupondo que 145 pares de bases de DNA estão enrolados em torno do octâmero de histona 1 ¾ vezes, estime o raio do octâmero de histona. Considere 3,4 Å por par de base e simplifique o cálculo supondo que a espiral é bidimensional, em vez de tridimensional, e negligenciando a espessura do DNA.

4. *Substituição de nitrogênio*. O crescimento de células de mamíferos na presença de 5-azacitidina resulta na ativação de alguns genes normalmente inativos. Proponha uma explicação.



5-azacitidina

5. *Um domínio novo*. Foi caracterizado um domínio proteico que reconhece 5-metilcitosina no contexto do DNA dupla fita. Que função poderiam ter as proteínas que contêm esse domínio na regulação da expressão gênica? Em que local de um DNA dupla fita poderia um domínio desse tipo se ligar?

6. *Receptor híbrido*. Graças a métodos de DNA recombinante foi preparado um receptor modificado de hormônio esteroide que consiste em um receptor de estrógeno com seu domínio de acoplamento ao ligante substituído pelo domínio de acoplamento ao ligante do receptor de progesterona. Preveja a responsividade da expressão gênica das células tratadas com estrógeno ou com progesterona.

7. *Diferentes modificações*. Qual é o efeito da acetilação de um resíduo de lisina na carga elétrica de uma proteína histona? Qual é o efeito da metilação da lisina?

8. *Transformador*. A sequência de aminoácidos de um dos quatro fatores de transcrição, mostrada adiante, é usada para gerar células iPS:

HTCDYAGCGKTYTKSSHLKAHLRTHTGEKPYHCDWDGCGWKFARSDELTRHYRKHTGHRPFQCQKCD

RAFSRSDHLALHMKRHF

Esse fator de transcrição pertence a uma das três classes estruturais comentadas na Seção 32.2. Identifique a classe.

9. *Cobertura*. Que porcentagem dos sítios de DNA na levedura é acessível, supondo que a fração de sítios observados em GAL4 é típica? A quantos pares de bases do genoma de levedura com 12 Mb esta porcentagem corresponde?

10. *Regulação do ferro*. Que efeito seria esperado do acréscimo de IRE à extremidade 5' de um gene que não é regulado normalmente pelos níveis de ferro? E do acréscimo à extremidade 3'?

11. *Previsão da regulação de microRNA*. Suponha que você identificou um miRNA que tem a sequência 5′-GCCUAGCCUUAGCAUUGAUUGG-3′. Proponha uma estratégia para identificar as sequências de todos os mRNA que podem ser regulados por esse miRNA, dadas as sequências de todos os mRNAs codificados pelo genoma humano.

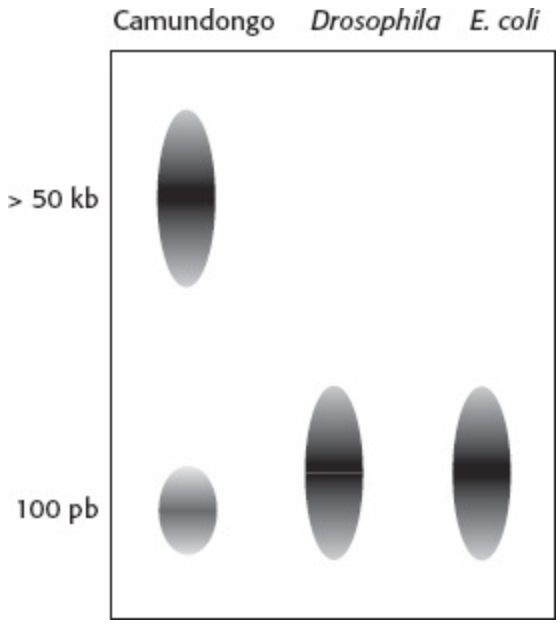
Questõ sobre mecanismo

12. *Acetiltransferases*. Proponha um mecanismo para a transferência de um grupo acetila da acetil-CoA para o grupo amino da lisina.

Questão Interpretação de dados

13. *Restrição limitada*. A enzima de restrição *Hpa*II é importante para a análise da metilação do

DNA. Essa enzima cliva sítios da forma 5′-CCGC-3′, embora não clive esses sítios se o DNA for metilado em quaisquer dos resíduos citosina. O DNA genômico de diferentes organismos é tratado com *Hpa*II e os resultados são analisados por eletroforese em gel (ver os padrões adjacentes). Dê uma explicação para os padrões observados.

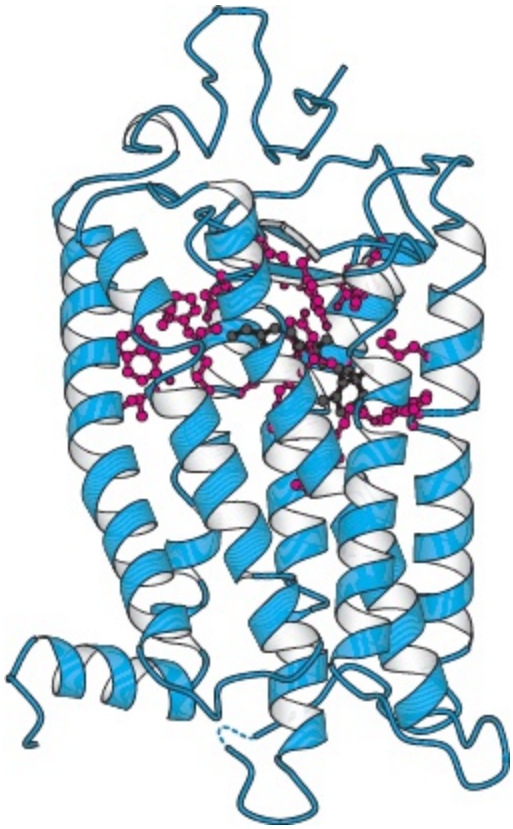


Parte 4

Reação a Alterações Ambientais

Parte 4

Reação a Alterações Ambientais



A percepção de cores requer a presença de fotorreceptores específicos. O fotorreceptor rodopsina (à direita), que absorve a luz no processo da visão, é constituído da proteína opsina e de um derivado da vitamina A ligado, o retinal. Os aminoácidos (mostrados em vermelho) que circundam o retinal determinam a cor da luz que é mais eficientemente absorvida. Uma pessoa que carece de um fotorreceptor de absorção de luz para a cor verde enxergará um balcão colorido de frutas (à esquerda) predominantemente na cor amarela (no meio). [Fotografias à esquerda e no meio, de L. T. Sharpe *et al*. In Color Vision: from Genes to Perception, K. Gegenfurtner e L. T. Sharpe, Eds. (Cambridge University Press, 1999), pp.3-51.]

SUMÁRIO

33.1 Uma ampla variedade de compostos orgânicos é detectada pela olfação

33.2 O paladar é uma combinação de sentidos que funcionam por mecanismos diferentes

33.3 As moléculas fotorreceptoras nos olhos detectam a luz visível

33.4 A audição depende da detecção rápida de estímulos mecânicos

33.5 O tato inclui a percepção de pressão, temperatura e outros fatores

Nossos sentidos nos fornecem meios para detectar um conjunto diverso de sinais externos, frequentemente com incrível sensibilidade e especificidade. Por exemplo, quando totalmente adaptados a uma sala escura, nossos olhos nos permitem perceber níveis muito baixos de luz até um limite de menos de 10 fótons. Com mais luz, somos capazes de distinguir milhões de cores. Por meio de nossos sentidos de olfato e paladar, somos capazes de detectar milhares de substâncias químicas em nosso ambiente e classificá-las em categorias: agradáveis ou desagradáveis? Saudáveis ou tóxicas? Por fim, podemos perceber estímulos mecânicos no ar e ao nosso redor pelos nossos sentidos de audição e tato.

Como funcionam nossos sistemas sensoriais? Como os estímulos iniciais são detectados? Como esses eventos bioquímicos iniciais são transformados em percepções e experiências? Já vimos sistemas que percebem sinais químicos e respondem a eles – isto é, receptores que se ligam a fatores de crescimento e a hormônios. Nossos conhecimentos sobre esses receptores e suas vias associadas de transdução de sinais nos fornecem conceitos e ferramentas para revelar alguns dos funcionamentos dos sistemas sensoriais. Por exemplo, os receptores 7TM (receptores que atravessam sete vezes a membrana; Seção 14.1) desempenham papéis essenciais no olfato, no paladar e na visão. Os canais iônicos que são sensíveis ao estresse mecânico são essenciais para a audição e o tato.

Neste capítulo, abordaremos para os cinco principais sistemas sensoriais encontrados nos seres humanos e em outros mamíferos: a olfação (o sentido de odor – isto é, a detecção de pequenas moléculas no ar), o paladar ou gustação (a detecção seletiva de compostos orgânicos e íons pela língua), a visão (a detecção da luz), a audição (a detecção do som ou ondas de pressão no ar) e o tato (a detecção pela pele de mudanças na pressão, na temperatura e em outros fatores). Cada um desses sistemas sensoriais primários contém neurônios sensoriais especializados, que transmitem impulsos nervosos ao sistema nervoso central (Figura 33.1). No sistema nervoso central, esses sinais são processados e combinados com outras informações, produzindo uma percepção que pode desencadear uma mudança no comportamento. Por esses meios, nossos sentidos nos permitem detectar mudanças no ambiente e ajustar adequadamente nosso comportamento.

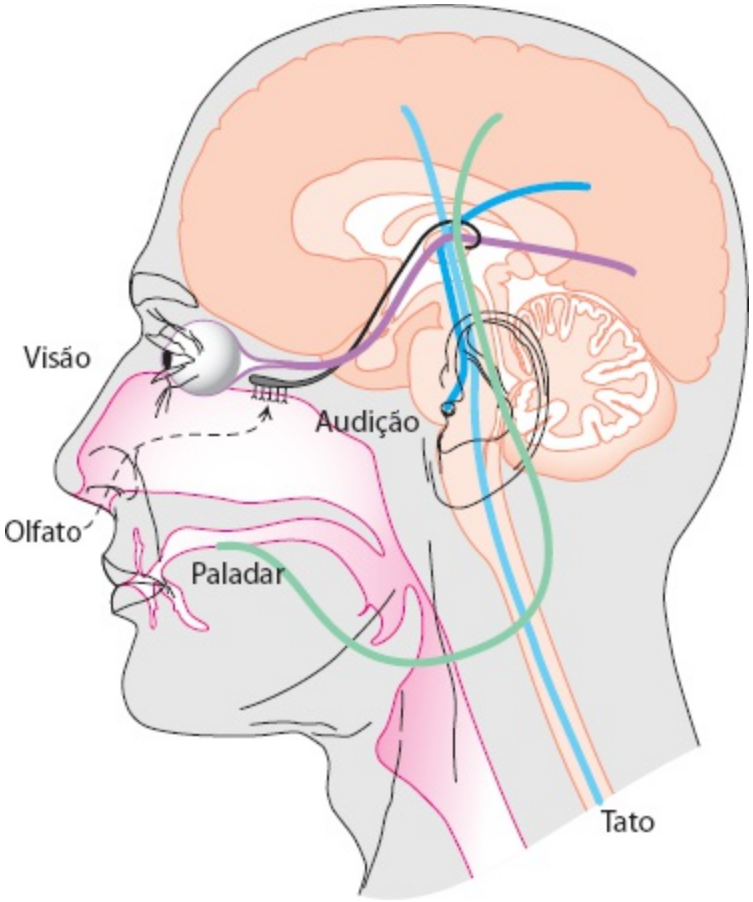
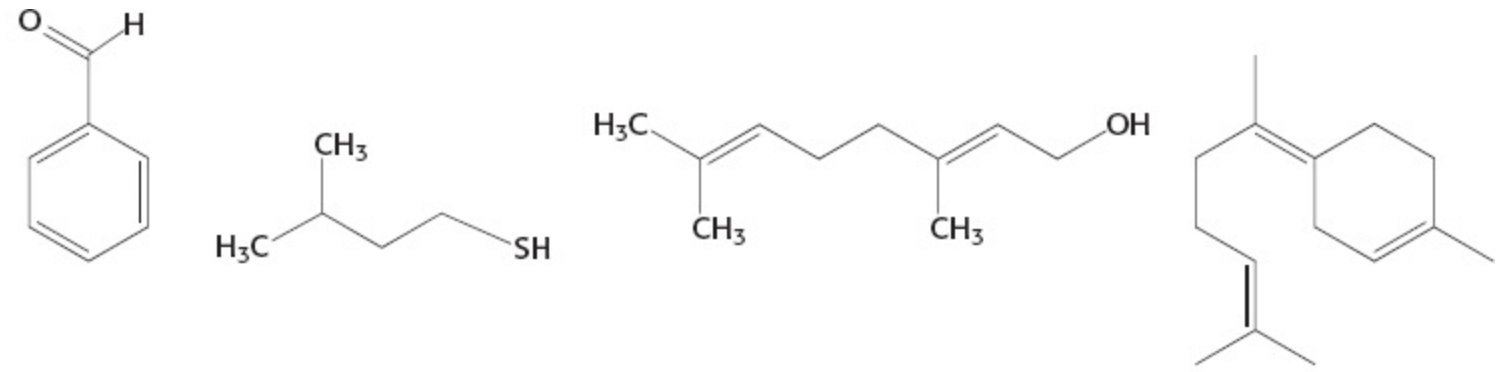


Figura 33.1 Conexões sensoriais com o cérebro. Os nervos sensoriais conectam os órgãos sensoriais com o cérebro e a medula espinal.

33.1 Uma ampla variedade de compostos orgânicos é detectada pela olfação

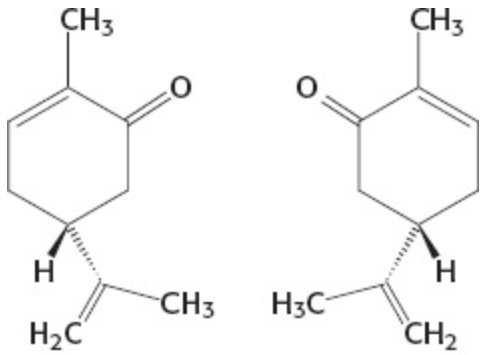
Os seres humanos podem detectar e distinguir milhares de compostos diferentes pelo olfato, frequentemente com considerável sensibilidade e especificidade. A maioria dos odorantes consiste em pequenos compostos orgânicos com volatilidade suficiente para que possam ser transportados como vapores até o nariz. Por exemplo, um componente importante responsável pelo odor de amêndoas é o composto aromático simples, o benzaldeído, enquanto o composto sulfidrílico, o 3-metilbutano-1-tiol, é o principal componente do odor dos gambás.



Benzaldeído (amêndoa) **3-metilbutano-1-tiol (gambá)** **Geraniol (rosa)** **Zingibereno (gengibre)**

Que propriedades dessas moléculas são responsáveis por seus odores? Em primeiro lugar, *a forma da molécula, mais do que as suas propriedades físicas, é crucial*. Podemos perceber mais

claramente a importância da forma se compararmos moléculas como as responsáveis pelos odores de hortelã e cominho. Esses compostos são idênticos em praticamente todas as propriedades físicas, como hidrofobicidade, visto que são imagens especulares exatas um do outro. Assim, o odor produzido por uma substância odorante depende não apenas de uma propriedade física, mas da interação do composto com uma superfície de ligação específica, mais provavelmente uma proteína receptora. Em segundo lugar, alguns seres humanos (e outros animais) sofrem de *anosmias específicas*, isto é, são incapazes de sentir o odor de compostos específicos, embora seus sistemas olfatórios sejam normais nos demais aspectos. Com frequência, essas anosmias são herdadas. Essas observações sugerem que mutações em genes de receptores individuais levam à perda da capacidade de detectar um pequeno subgrupo de compostos.



A olfação é mediada por uma enorme família de receptores com sete hélices transmembranares

Os odorantes são detectados por uma região específica do nariz, denominada *epitélio olfatório principal*, localizada na parte superior da cavidade nasal (Figura 33.2). A superfície dessa região é revestida por aproximadamente 1 milhão de neurônios sensoriais. Cílios contendo os receptores que ligam odoríferos projetam-se desses neurônios para a mucosa que reveste a cavidade nasal.

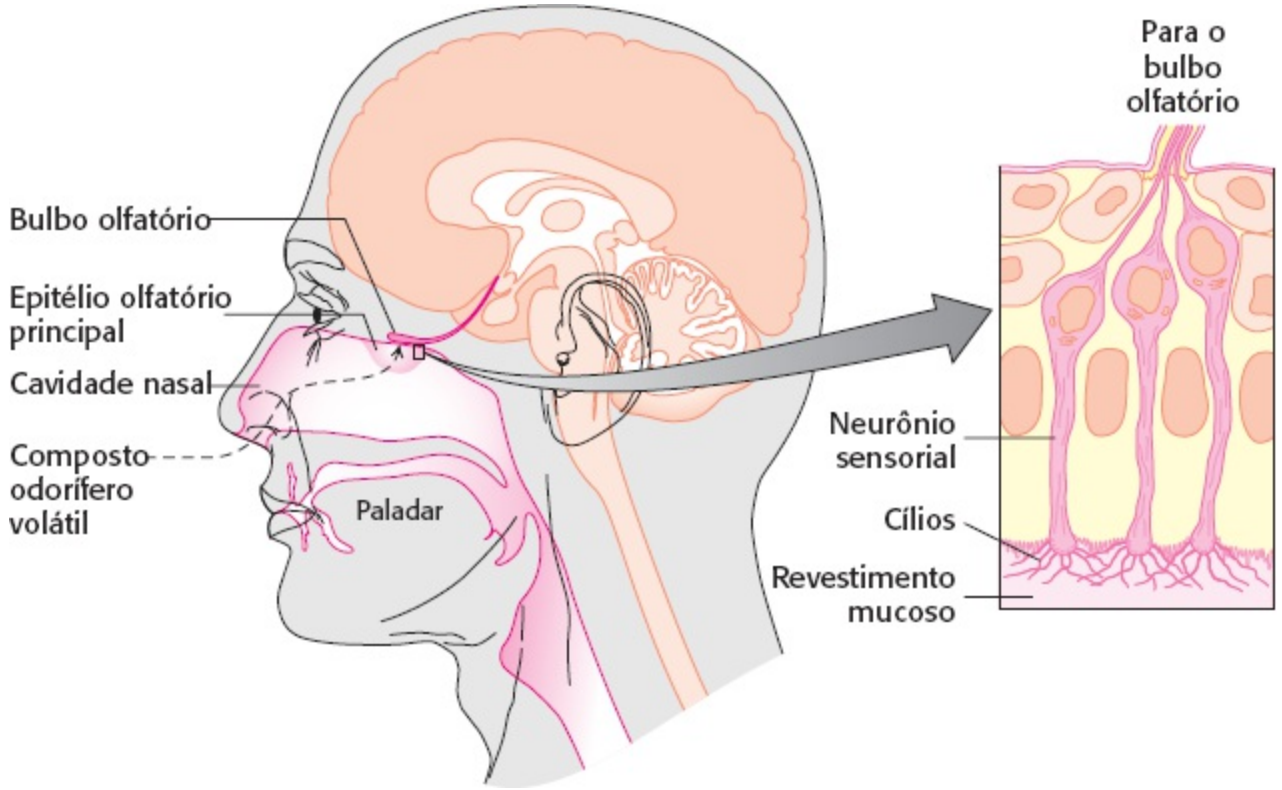


Figura 33.2 Epitélio nasal principal. Essa região do nariz, situada na parte superior da cavidade nasal, contém aproximadamente um milhão de neurônios sensoriais. Os impulsos nervosos gerados por moléculas odoríferas que se ligam a receptores nos cílios propagam-se dos neurônios sensoriais para o bulbo olfatório.

Estudos bioquímicos no final da década de 1980 examinaram cílios isolados do epitélio olfatório do rato que haviam sido tratados com substâncias odoríferas. A exposição às substâncias odoríferas aumentou o nível celular de AMP cíclico, e esse aumento só foi observado na presença de GTP. Com base no que se sabia acerca dos sistemas de transdução de sinais, *a participação do cAMP e do GTP sugeriu fortemente a participação de uma proteína G e, portanto, de receptores 7TM*. Com efeito, Randall Reed purificou e clonou uma subunidade α de proteína G denominada $G_{(olf)}$, que é exclusivamente expressa nos cílios olfatórios. A participação de receptores 7TM sugeriu uma estratégia para a identificação dos próprios receptores olfatórios. Foram procurados DNA complementares que fossem (1) expressos principalmente nos neurônios sensoriais que revestem o epitélio nasal, (2) membros codificados da família de receptores 7TM e (3) presentes como uma grande família diversa para explicar a gama de substâncias odoríferas. Com a utilização desses critérios, Richard Axel e Linda Buck em 1991, identificaram cDNA para receptores odoríferos de ratos.

A família de receptores odoríferos (designados, daí em diante, como RO) é ainda maior do que se imaginava: mais de 1.000 genes RO estão presentes no camundongo e no rato, enquanto o genoma humano codifica aproximadamente 380 RO. Além disso, o genoma humano inclui aproximadamente 500 pseudogenes RO contendo mutações que impedem a geração de um receptor odorífero apropriado e completo. Por conseguinte, a família de RO é uma das maiores famílias de genes nos seres humanos. Análises detalhadas de gênese RO de primatas revelaram que a fração de pseudogenes é maior em espécies mais estreitamente relacionadas com os seres humanos (Figura 33.3). Assim, podemos ter uma ideia da perda evolutiva da acuidade do olfato à medida que os mamíferos superiores presumivelmente se tornaram menos dependentes desse sentido para a sua

sobrevivência. Nos roedores que dependem altamente do sentido do olfato, praticamente todos os genes RO codificam proteínas funcionais.

Figura 33.3 Evolução dos receptores odoríferos. Os receptores odoríferos parecem ter perdido a função em decorrência de conversão em pseudogenes durante a evolução dos primatas. A porcentagem de genes de RO que parecem ser funcionais para cada espécie está indicada entre parênteses.

As proteínas RO tipicamente têm uma identidade de sequência de 20% com o receptor β–adrenérgico (Seção 14.1) e de 30 a 60% entre si. Várias características específicas de sequência são encontradas na maioria dos membros da família de RO ou em todos eles (Figura 33.4). A região central, particularmente as hélices transmembranares 4 e 5, é altamente variável, sugerindo que essa região constitui o local de ligação de substância odoríferas. Esse local deve ser diferente nos receptores odoríferos que se ligam a moléculas odoríferas distintas.

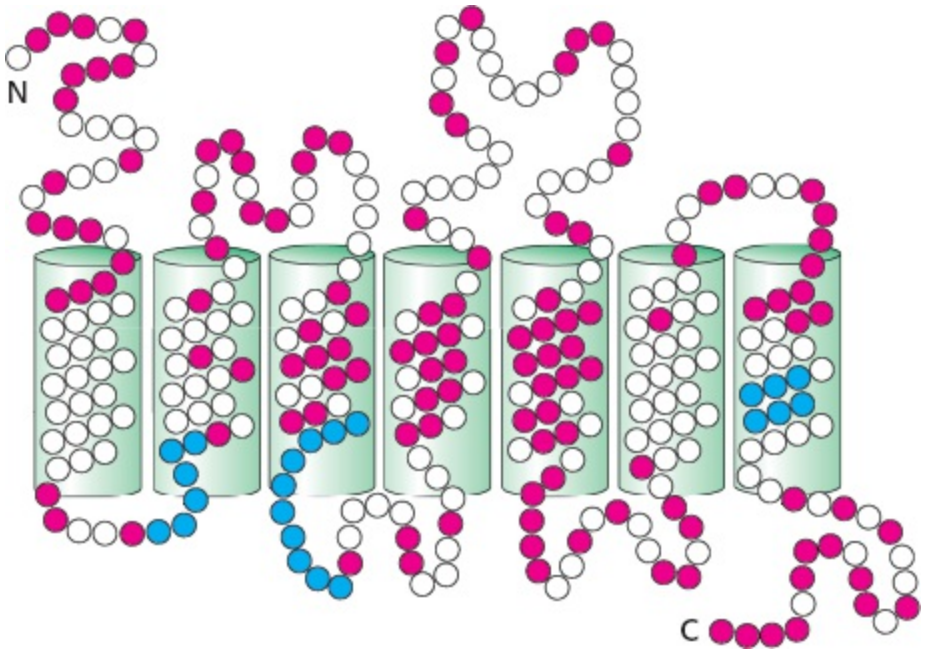


Figura 33.4 Regiões conservadas e variantes nos receptores odoríferos. Os receptores odoríferos são membros da

família de receptores 7TM. Os cilindros verdes representam as sete supostas hélices transmembranares. Os resíduos altamente conservados característicos dessa família de proteínas são mostrados em azul, enquanto os resíduos altamente variáveis aparecem em vermelho.

Qual a relação entre a expressão dos genes RO e o neurônio individual? Curiosamente, *cada neurônio olfatório expressa apenas um único gene RO*, entre centenas disponíveis. Aparentemente, o gene RO preciso expresso é determinado, em grande parte, de modo aleatório. Após a expressão de um gene RO, e uma vez produzida uma proteína RO funcional, a expressão de todos os outros genes RO é suprimida por um mecanismo de retroalimentação que ainda não foi totalmente elucidado.

A ligação de uma substância odorífera a um RO na superfície neuronal dá início a uma cascata de transdução de sinais, que resulta em um potencial de ação (Figura 33.5). O RO ligado ao ligante ativa a $G_{(olf)}$, a proteína G específica mencionada anteriormente. A $G_{(olf)}$ está inicialmente em sua forma ligada ao GDP. Quando ativada, libera GDP, liga-se ao GTP e libera suas subunidades βγ associadas. Em seguida, a subunidade α ativa uma adenilato ciclase específica, aumentando a concentração intracelular de cAMP. A elevação da concentração intracelular de cAMP ativa um canal inespecífico de cátions, que possibilita a entrada de cálcio e de outros cátions na célula. O fluxo de cátions através do canal despolariza a membrana neuronal e dá início a um potencial de ação. Esse potencial de ação, combinado ao de outros neurônios olfatórios, leva à percepção de um odor específico.

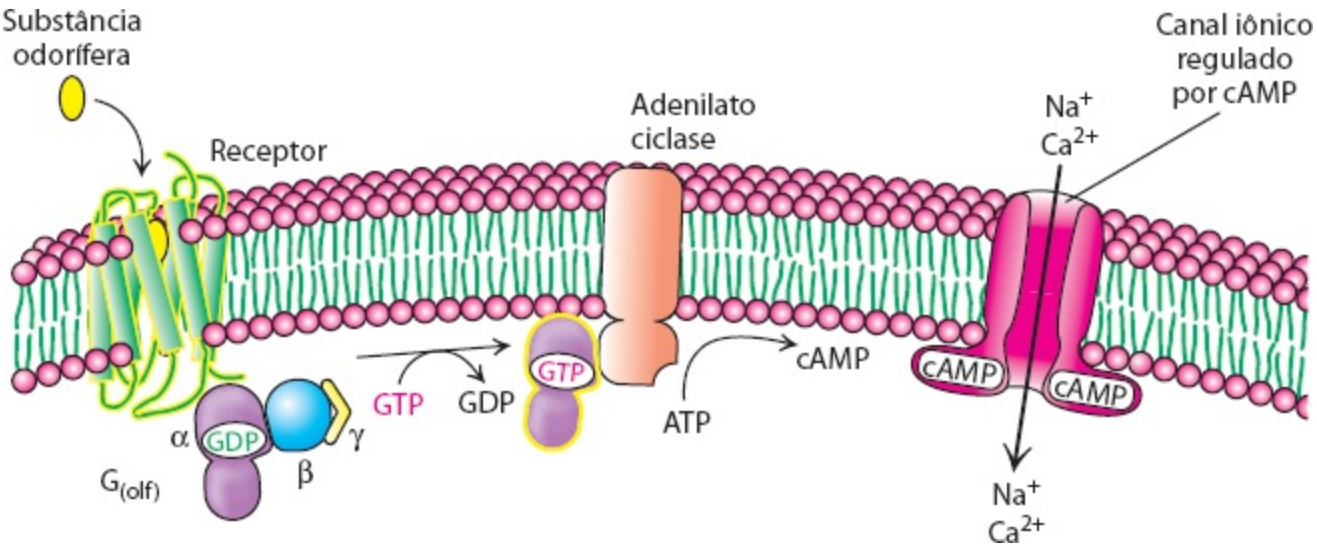


Figura 33.5 Cascata de transdução do sinal olfatório. A ligação de uma substância odorífera ao receptor olfatório ativa uma via de sinalização semelhante àquelas iniciadas em resposta à ligação de alguns hormônios a seus receptores. O resultado final é a abertura de canais iônicos regulados por cAMP e o início de um potencial de ação.

As substâncias odoríferas são decodificadas por um mecanismo combinatório

Um desafio óbvio enfrentado pelo pesquisador em virtude do grande tamanho da família RO é estabelecer a correspondência de cada RO com uma ou mais moléculas odoríferas às quais ele se liga. Foram feitos enormes progressos nesse aspecto. Inicialmente, um RO foi correlacionado com substâncias odoríferas pela hiperexpressão de um único gene RO específico em ratos. Esse RO respondeu a aldeídos de cadeia linear, mais favoravelmente ao *n*-octanol e com menos intensidade ao *n*-heptanal e ao *n*-hexanal. Foram feitos progressos mais notáveis tirando proveito de nossos conhecimentos sobre a via de transdução de sinais de RO e o poder da reação em cadeia de

polimerase (PCR). Um corte de epitélio nasal de um camundongo foi exposto ao corante sensível ao cálcio, Fura-2 (Seção 14.1). Em seguida, o tecido foi tratado com diferentes moléculas odoríferas, uma de cada vez, em uma concentração específica. Se a substância odorífera se ligasse a um RO e o ativasse, esse neurônio poderia ser detectado ao microscópio pela mudança de fluorescência causada pelo influxo de cálcio que ocorre como parte do processo de transdução de sinais. Para determinar qual RO era responsável pela resposta, foi gerado um mRNA a partir de cDNA isolado de neurônios individuais identificados. Em seguida, o cDNA foi submetido à PCR com o uso de iniciadores (*primers*) que são efetivos na amplificação da maioria ou de todos os genes RO. A sequência do produto de PCR de cada neurônio foi então determinada e analisada.

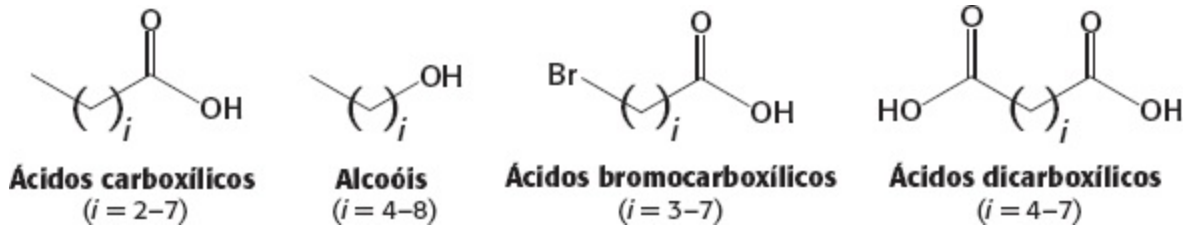


Figura 33.6 Quatro séries de substâncias odoríferas testadas quanto à ativação de receptores olfatórios.

Utilizando essa abordagem, os pesquisadores analisaram as respostas dos neurônios a uma série de compostos com comprimentos de cadeia e grupos funcionais terminais variáveis (Figura 33.6). Os resultados desses experimentos parecem surpreendentes à primeira vista (Figura 33.7). O aspecto importante é a inexistência de uma simples correspondência 1:1 entre substâncias odoríferas e receptores. *Quase todas as moléculas odoríferas ativam diversos receptores* (habitualmente com intensidades diferentes), *e quase todos os receptores são ativados por mais de uma substância odorífera*. Entretanto, observe que cada substância odorífera ativa uma combinação exclusiva de receptores. Em princípio, esse mecanismo combinatório faz com que até mesmo um pequeno conjunto de receptores seja capaz de distinguir uma enorme quantidade de substâncias odoríferas.

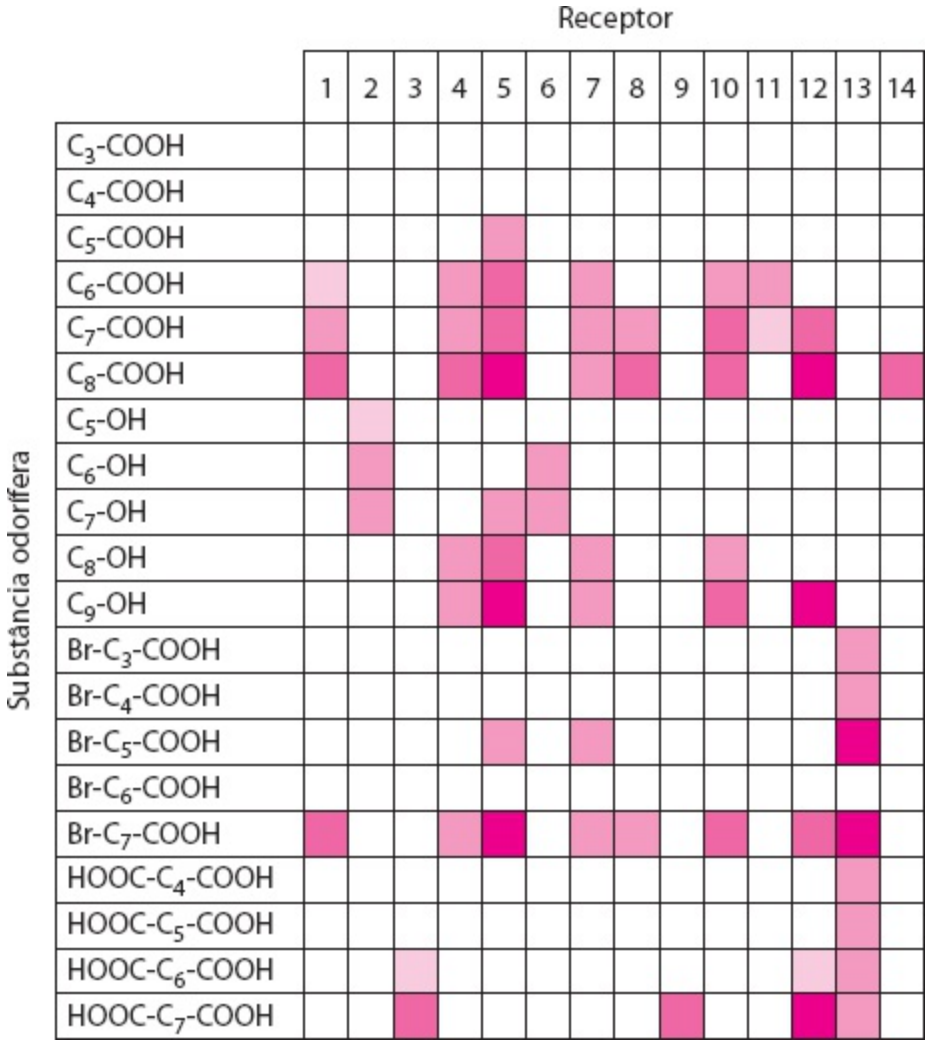


Figura 33.7 Padrões de ativação de receptores olfatórios. Foram testados 14 receptores diferentes quanto à sua responsividade aos compostos mostrados na Figura 33.6. Um quadrado colorido indica que o receptor na parte superior respondeu ao composto indicado à esquerda. As cores mais intensas indicam que o receptor foi ativado em uma concentração menor de substância odorífera.

Como é transmitida para o cérebro a informação sobre quais receptores foram ativados? Convém lembrar que cada neurônio só expressa um RO, e que o padrão de expressão parece ser, em grande parte, aleatório. Um indício substancial para as conexões entre os receptores e o cérebro foi fornecido pela criação de camundongos que expressam um gene para um marcador colorido facilmente detectável em associação a um gene RO específico. Os neurônios olfatórios que expressam a combinação de RO-proteína marcadora foram rastreados até o seu destino no cérebro, uma estrutura denominada bulbo olfatório (Figura 33.8). Foi constatado que os processos dos neurônios que expressam o mesmo gene RO se conectam com o mesmo local no bulbo olfatório. Além disso, verificou-se que esse padrão de conexão neuronal era idêntico em todos os camundongos examinados. Por conseguinte, *os neurônios que expressam RO específicos estão ligados a áreas específicas no cérebro*. Essa propriedade cria um mapa espacial da atividade neuronal responsiva a substâncias odoríferas dentro do bulbo olfatório.

É possível que esse tipo de mecanismo combinatório seja capaz de distinguir verdadeiramente muitas substâncias odoríferas diferentes? Um "nariz" eletrônico que funciona pelos mesmos princípios fornece evidências convincentes de que isso é possível (Figura 33.9). Os receptores do nariz eletrônico são polímeros que se ligam a uma variedade de moléculas pequenas. Cada polímero liga-se a todas as substâncias odoríferas, porém em graus variados. O importante é que todas as

propriedades elétricas desses polímeros mudam com a ligação da substância odorífera. Um conjunto de 32 desses polímeros sensores, ligados de modo que o padrão de respostas possa ser avaliado, é capaz de distinguir compostos individuais, como *n*-pentano e *n*-hexano, bem como misturas complexas, como os odores de frutas frescas e estragadas.

Figura 33.8 Neurônios olfatórios convergentes. Esse corte da cavidade nasal é corado para revelar processos de neurônios sensoriais que expressam o mesmo receptor olfatório. Os processos convergem para uma única localização no bulbo olfatório. [De P. Mombaerts *et al. Cell* 87:675-689, 1996.].

Figura 33.9 O Cyranose 320. O nariz eletrônico pode ter aplicação na indústria alimentar, na criação de animais, em casos legais e na medicina. [Cortesia de Cyrano Sciences].

33.2 O paladar é uma combinação de sentidos que funcionam por mecanismos diferentes

A incapacidade de saborear o alimento é uma queixa comum quando a congestão nasal reduz a olfação. Por conseguinte, o olfato aumenta acentuadamente o paladar (também conhecido como gustação), e o paladar é, em muitos aspectos, o sentido irmão da olfação. Entretanto, os dois sentidos diferem um do outro em vários aspectos importantes. Em primeiro lugar, somos capazes de sentir várias classes de compostos pelo paladar que não conseguimos detectar pelo olfato; o sal e o açúcar têm pouco odor e, apesar disso, constituem estímulos primários do sistema gustativo. Em segundo lugar, enquanto podemos discriminar milhares de substâncias odoríferas, a discriminação pelo paladar é muito mais modesta. São percebidos cinco sabores primários: amargo, doce, azedo, salgado e *umami* (o sabor do glutamato e do aspartato, da palavra japonesa que significa "delicioso"). Esses cinco sabores servem para classificar os compostos em potencialmente nutritivos e benéficos (doce, salgado, umami) ou potencialmente prejudiciais ou tóxicos (amargo, azedo). Os sabores (moléculas percebidas pelo paladar) são muito distintos para os diferentes grupos (Figura 33.10).

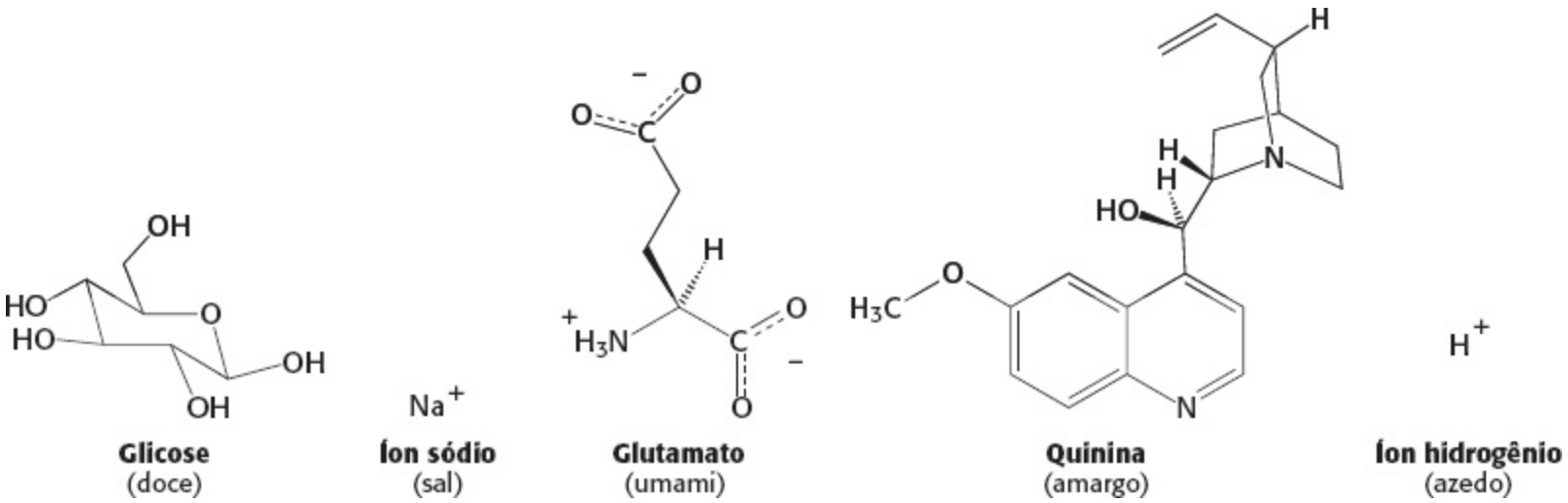


Figura 33.10 Exemplos de moléculas de sabores. Os sabores são classificados em cinco grupos: doce, salgado, umami, amargo e azedo.

O sabor mais simples, o íon hidrogênio, é percebido como azedo. Outros íons simples, particularmente o íon sódio, são percebidos como salgados. O sabor denominado umami é produzido pelos aminoácidos glutamato e aspartato, sendo o primeiro frequentemente encontrado como glutamato monossódico (MSG, *do inglês monosodium glutamate*), um realçador de sabor. Por outro lado, *os sabores percebidos como doce e, especialmente, amargo são extremamente diversos*. Muitos compostos amargos são alcaloides ou outros produtos vegetais, e muitos destes são tóxicos. Entretanto, não apresentam quaisquer elementos estruturais ou outras propriedades em comum. Os carboidratos, como a glicose e a sacarose, são percebidos como doces, assim como outros compostos, incluindo alguns derivados peptídicos, como o aspartame, e até mesmo algumas proteínas. Essas diferenças de especificidade entre os cinco sabores devem-se a diferenças nos seus mecanismos bioquímicos subjacentes. Na verdade, o sentido do paladar corresponde a vários sentidos independentes que utilizam o mesmo órgão, a língua, para a sua expressão.

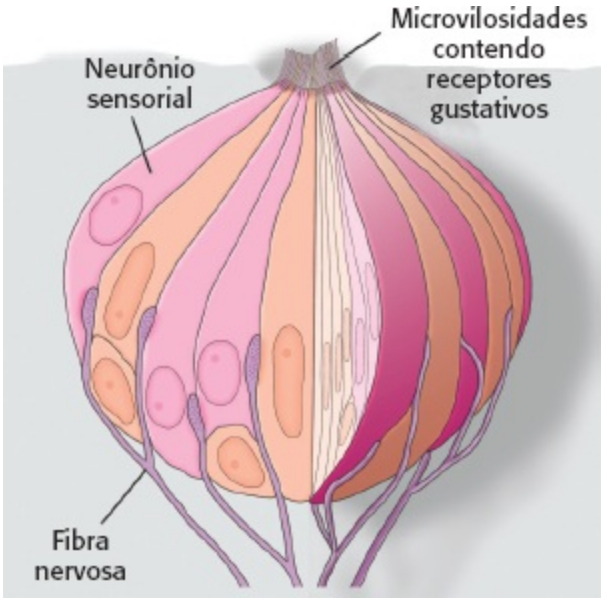


Figura 33.11 Botão gustativo. Cada botão gustativo contém neurônios sensoriais que projetam microvilosidades para a superfície da língua, onde interagem com sabores.

Os sabores são detectados por estruturas especializadas, denominados botões gustativos, que contêm aproximadamente 150 células, incluindo neurônios sensoriais (Figura 33.11). Projeções digitiformes, denominadas microvilosidades, que são ricas em receptores gustativos, projetam-se de uma extremidade de cada neurônio sensorial para a superfície da língua. As fibras nervosas na extremidade oposta de cada neurônio levam impulsos elétricos para o cérebro em resposta à estimulação pelos sabores. Estruturas denominadas *papilas gustativas* contêm numerosos botões gustativos.

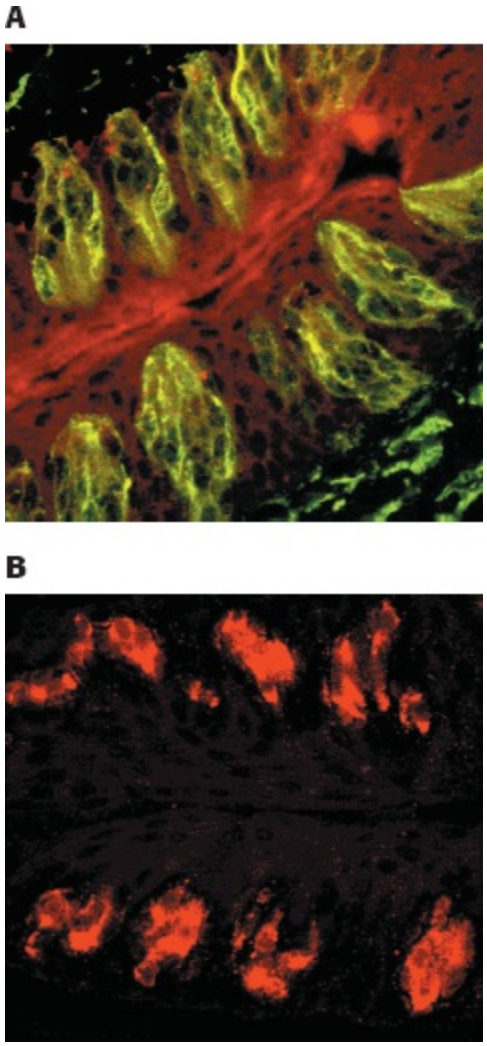
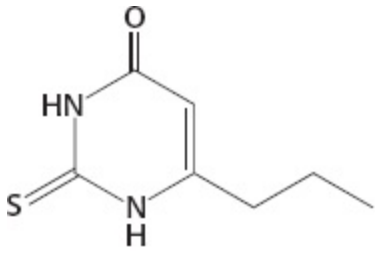


Figura 33.12 Expressão da gustducina na língua. **A**. Um corte de língua corada com um anticorpo fluorescente revela a posição dos botões gustativos. **B**. A mesma região corada com um anticorpo dirigido contra a gustducina revela que essa proteína G expressa nos botões gustativos. [Cortesia do Dr. Charles S. Zuker].

O sequenciamento do genoma humano levou à descoberta de uma grande família de receptores de sabor amargo 7TM

À semelhança da olfação, vários indícios apontaram para a participação das proteínas G e, portanto, de receptores 7TM na detecção dos sabores amargo e doce. As evidências incluíram o isolamento de uma subunidade α de uma proteína G específica, denominada *gustducina*, que é expressa principalmente nos botões gustativos (Figura 33.12). Como os receptores 7TM poderiam ser identificados? A capacidade de detectar alguns compostos depende de *loci* genéticos específicos tanto nos seres humanos como nos camundongos. Por exemplo, a capacidade de sentir o composto amargo 6-*n*-propil-2-tiouracila (PROP) foi mapeada em uma região do cromossomo 5 humano ao comparar marcadores de DNA de indivíduos que variam na sua sensibilidade a esse composto.

Essa observação sugeriu que essa região poderia codificar um receptor 7TM que respondesse à PROP. Aproximadamente 450 quilobases nessa região foram sequenciadas no início do projeto do genoma humana. Essa sequência foi analisada por métodos computacionais à procura de genes potenciais do receptor 7TM e, com efeito, um deles foi detectado e denominado *T2R1*. Outras pesquisas de bancos de dados detectaram aproximadamente 30 sequências semelhantes à *T2R1* no genoma humano. As proteínas codificadas tinham uma identidade de 30 a 70% com o T2R1 (Figura 33.13)



6-*n*-propil-2-tiouracila (PROP)

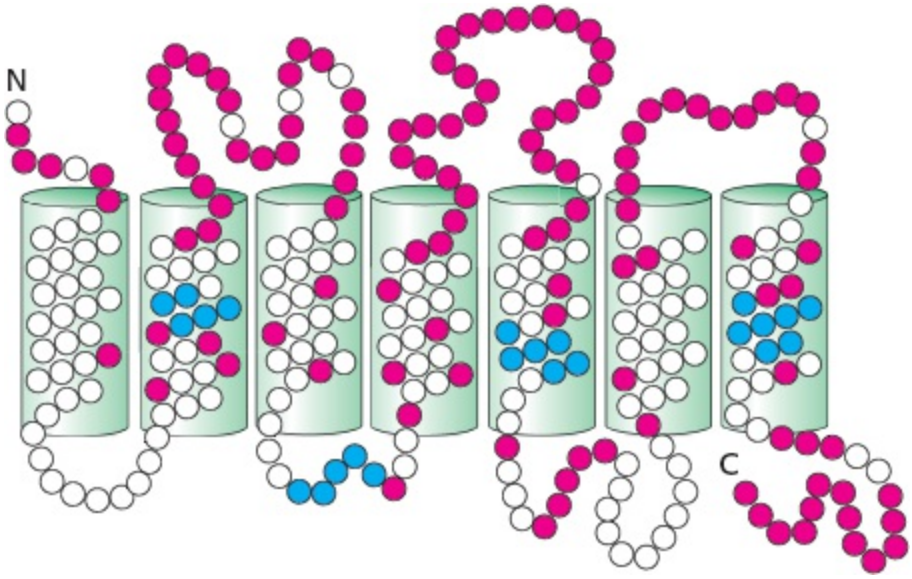


Figura 33.13 Regiões conservadas e variantes nos receptores de sabor amargo. Os receptores de sabor amargo são membros da família de receptores 7TM. Os resíduos fortemente conservados característicos dessa família de proteínas são mostrados em azul, enquanto os resíduos altamente variáveis aparecem em vermelho.

Essas proteínas são, de fato, receptores de sabor amargo? Várias linhas de evidências sugerem que sim. Em primeiro lugar, seus genes são expressos em células sensíveis a sabores – de fato, em muitas das mesmas células que expressam a gustducina. Em segundo lugar, as células que expressam membros individuais dessa família respondem a compostos amargos específicos. Por exemplo, células que expressam um receptor murino específico (mT2R5) responderam quando expostos especificamente à ciclo-heximida. Em terceiro lugar, foi constatado que camundongos que não responderam à ciclo-heximida tinham mutações pontuais no gene que codifica T2R5. Por fim, a ciclo-heximida estimula especificamente a ligação de análogos de GTP à gustducina na presença da proteína T2R5 (Figura 33.14).

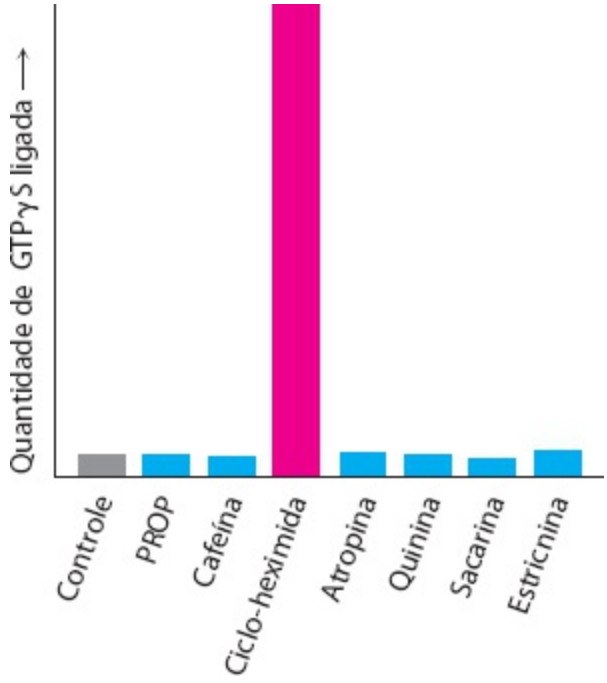


Figura 33.14 Evidência de que as proteínas T2R são receptores de sabor amargo. A ciclo-heximida estimula especificamente a ligação do análogo do GTPγS à gustducina na presença da proteína mT2R. [De J. Chandrashekar *et al*. Cell 100:703-711, 2000.].

É importante observar que cada célula de receptor gustativo expressa muitos membros diferentes da família T2R. Esse padrão de expressão contrasta nitidamente com o padrão de um tipo de receptor por célula, que caracteriza o sistema olfatório (Figura 33.15). A diferença nos padrões de expressão contribui para a especificidade muito maior de nossa percepção de odores, em comparação com os sabores. *Somos capazes de distinguir entre odores sutilmente diferentes, visto que cada substância odorífera estimula um padrão único de neurônios. Em contrapartida, muitos sabores estimulam os mesmos neurônios*. Por conseguinte, percebemos apenas o "amargo" sem a capacidade de discriminar entre ciclo-heximida e quinina.

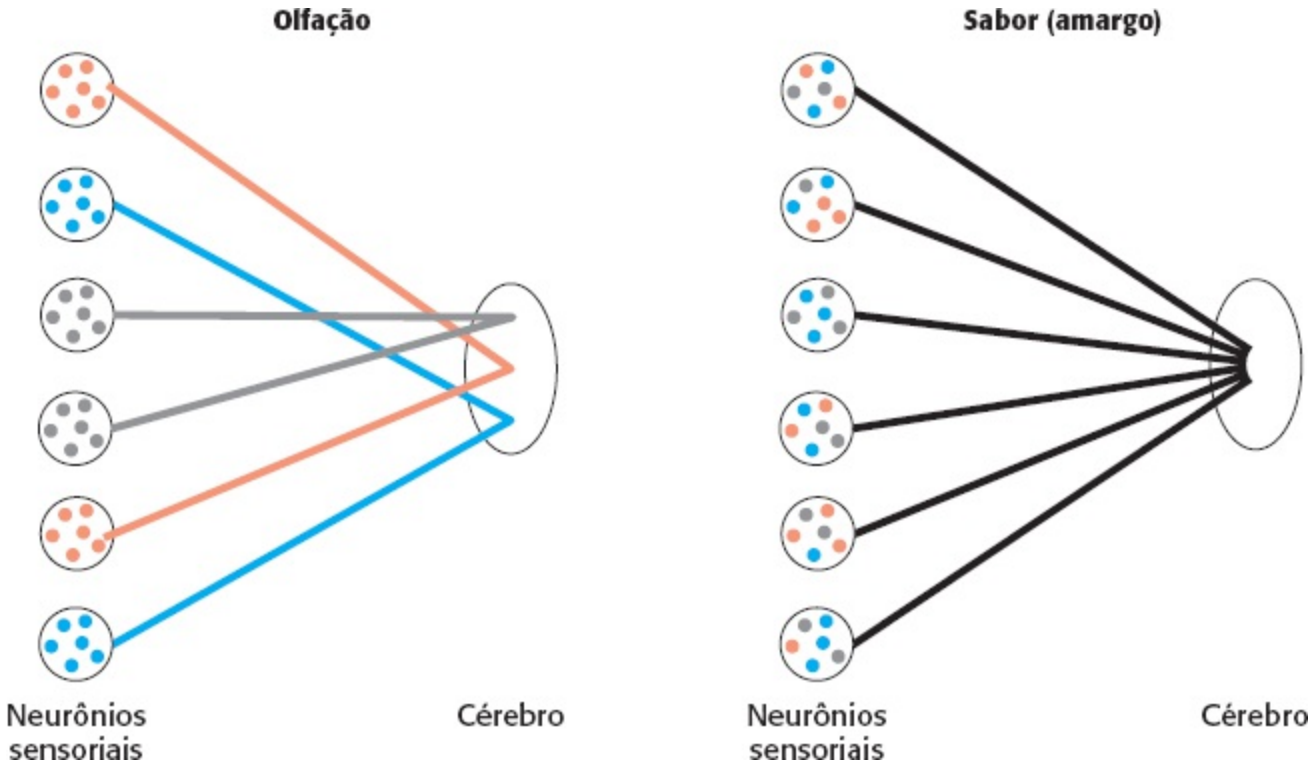


Figura 33.15 Diferenças de expressão gênica e de padrões de conexão nos receptores olfatórios e receptores de sabor amargo. Na olfação, cada neurônio expressa um único gene RO, e os neurônios que expressam o mesmo RO convergem para locais específicos no cérebro, possibilitando a percepção específica de diferentes substâncias odoríferas. Na gustação, cada neurônio expressa muitos genes de receptores de sabor amargo, de modo que a identidade do sabor é perdida na transmissão.

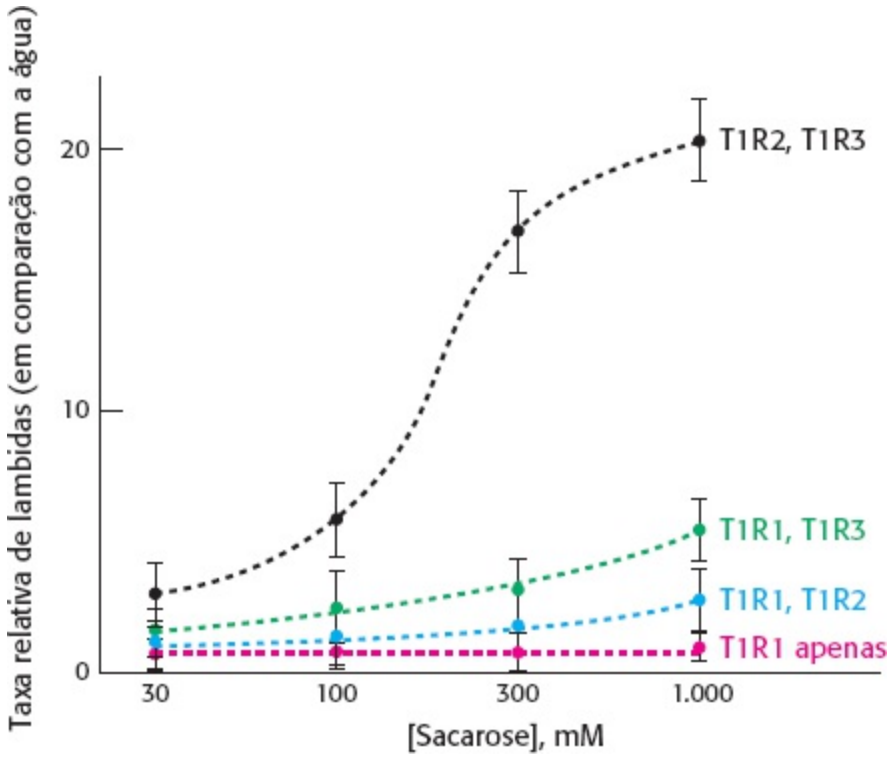


Figura 33.16 Evidência de um receptor heterodimérico para sabor doce. A sensibilidade de camundongos com genes para T1R1, T1R2, T1R3 ou para ambos T1R2 e T1R3 ao sabor doce foi determinada por meio da observação das taxas relativas de lambidas de soluções contendo várias quantidades de sacarose. Esses estudos revelaram que ambos os T1R1 e T1R3 foram necessários para uma resposta completa à sacarose. Os camundongos com um gene T1R1 destruído foram indistinguíveis dos camundongos de tipo selvagem nesse ensaio (não mostrado). [De G. Q. Zhao *et al*. Cell 115:255-266, 2003].

Um receptor 7TM heterodimérico responde a compostos doces

Os compostos doces são, em sua maioria, carboidratos, ricos em energia e facilmente digeríveis. Alguns compostos que não são carboidratos, como a sacarina e o aspartame, também têm sabor doce. Os membros de uma segunda família de receptores 7TM são expressos em células receptores de sabor sensíveis ao doce. Os três membros dessa família, designados como T1R1, T1R2 e T1R3, são diferenciados por seus grandes domínios extracelulares, em comparação com os receptores de sabor amargo. Estudos realizados em camundongo *knockout* revelaram que o T1R2 e o T1R3 são expressos simultaneamente em camundongos capazes de sentir o sabor de carboidratos (Figura 33.16). Por conseguinte, o T1R2 e o T1R3 parecem formar um receptor heterodimérico específico responsável por mediar a resposta a acúcares. Esse receptor heterodimérico também responde a adoçantes artificiais e a proteínas de sabor doce e, portanto, parece ser o receptor responsável pelas respostas a todos os sabores doces. Observe que o T1R1 e o T1R3 respondem individualmente a sabores doces porém apenas em concentrações muito altas do sabor.

A necessidade de um receptor 7TM *oligomérico* para uma resposta totalmente funcional é surpreendente, tendo em vista o nosso conhecimento prévio dos receptores 7TM. Essa descoberta tem pelo menos duas explicações possíveis. Na primeira, o receptor de sabor doce poderia ser um

membro de um pequeno subconjunto da família de receptores 7TM, capaz de funcionar bem apenas na forma de oligômeros. Alternativamente, muitos receptores 7TM podem atuar como oligômeros, porém essa ideia não está bem clara, visto que esses oligômeros só contêm um tipo de subunidade do receptor 7TM. São necessários estudos adicionais para determinar qual dessas explicações é correta.

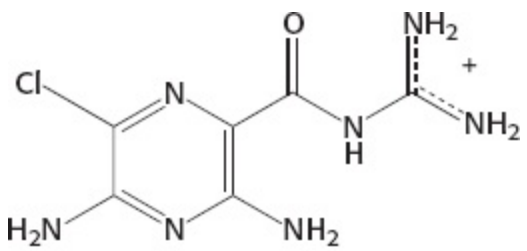
O umami, o sabor de glutamato e aspartato, é mediado por um receptor heterodimérico relacionado com um receptor de sabor doce

A família de receptores responsáveis pela detecção do sabor doce também é responsável pela detecção de aminoácidos. Nos seres humanos, apenas o glutamato e o aspartato produzem uma resposta gustativa. Estudos semelhantes aos do receptor de sabor doce revelaram que o receptor de umami é constituído de T1R1 e T1R3. Por conseguinte, esse receptor tem uma subunidade (T1R3) em comum com o receptor de sabor doce, porém apresenta uma subunidade adicional (T1R1) que não participa na resposta ao sabor doce. Essa observação é sustentada pela constatação de que os camundongos nos quais o gene T1R1 é destruído não respondem ao aspartato, porém apresentam uma resposta normal a sabores doces; camundongos que tiverem os genes destruídos para ambos os T1R1 e T1R3 respondem pouco aos sabores umami e doce.

Os sabores salgados são detectados principalmente pela passagem de íons sódio através de canais

Os sabores salgados não são detectados por receptores 7TM. Na verdade, são detectados diretamente pela sua passagem através de canais iônicos expressos na superfície de células na língua. As evidências do papel desempenhado por esses canais iônicos proveem do exame de propriedades conhecidas dos canais de Na^+ caracterizados em outros contextos biológicos. Uma classe de canais, caracterizada inicialmente pelo seu papel na reabsorção de sal, é considerada importante na detecção dos sabores salgados, visto que esses canais são sensíveis ao composto *amilorida*, que abafa o sabor de sal e reduz significativamente a ativação de neurônios sensoriais em resposta ao sódio.

Um *canal de Na^+ sensível à amilorida* é constituído de quatro subunidades, que podem ser idênticas ou distintas, mas que de qualquer modo são homólogas. Uma subunidade individual varia de 500 a 1.000 aminoácidos de comprimento e inclui duas possíveis hélices transmembranares, bem como um grande domínio extracelular entre elas (Figura 33.17). A região extracelular inclui duas (ou algumas vezes, três) regiões distintas, ricas em resíduos de cisteína (e, presumivelmente, pontes de dissulfeto). Uma região logo antes da segunda hélice transmembranar parece formar parte do poro, de modo análogo ao do canal de potássio de estrutura caracterizada. Os membros da família do canal de Na^+ sensível à amilorida são numerosos e diversificados em suas funções biológicas. Iremos encontrá-los novamente no contexto do sentido do tato.



Amilorida

Os íons sódio que passam por esses canais produzem uma corrente transmembranar significativa. A amilorida bloqueia esta corrente, explicando seu efeito sobre o paladar. Todavia, cerca de 20% da resposta ao sódio permanece mesmo na presença de amilorida, sugerindo que outros canais iônicos também contribuam para a detecção de sal.

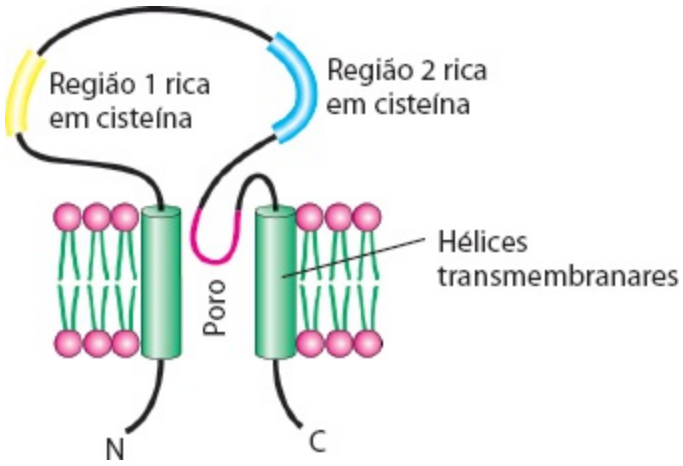


Figura 33.17 Estrutura esquemática do canal de sódio sensível à amilorida. Apenas uma das quatro subunidades que constituem o canal funcional está ilustrada. O canal de sódio sensível à amilorida pertence a uma superfamília que apresenta características estruturais comuns, incluindo duas regiões hidrofóbicas que atravessam a membrana, extremidades aminoterminal e carboxiterminal intracelulares, e uma grande região extracelular com domínios ricos em cisteína conservados.

O sabor azedo surge dos efeitos dos íons hidrogênio (ácidos) nos canais

À semelhança dos sabores salgados, os *sabores azedos são detectados por interações diretas com canais iônicos*, porém os íons que chegam são íons hidrogênio (em altas concentrações) em lugar de íons sódio. Por exemplo, na ausência de altas concentrações de sódio, o fluxo de íons hidrogênio pode induzir correntes transmembranares substanciais através dos canais Na^+ sensíveis à amilorida. Todavia, os íons hidrogênio também são percebidos por outros mecanismos além de sua passagem direta através das membranas. A ligação de íons hidrogênio bloqueia alguns canais de potássio, enquanto ativa outros tipos de canais. Em conjunto, esses mecanismos levam a mudanças na polarização da membrana nos neurônios sensoriais que produzem a sensação de sabor azedo. Consideraremos outro receptor relacionado com a gustação, responsável pelo sabor "quente" do alimento picante, quando examinarmos os mecanismos de percepção do tato.

33.3 As moléculas fotorreceptoras nos olhos detectam a luz visível

A visão baseia-se na absorção da luz por células fotorreceptoras no olho. Essas células são sensíveis à luz em uma região estreita do espectro eletromagnético, a região com comprimento de ondas entre 300 e 850 nm (Figura 33.18). Os vertebrados apresentam dois tipos de células fotorreceptoras, denominadas *bastonetes* e *cones*, devido a suas formas diferentes. Os cones funcionam na luz brilhante e são responsáveis pela visão em cores, enquanto os bastonetes funcionam com pouca luz, mas não percebem cor. A retina humana contém cerca de 3 milhões de cones e 100 milhões de bastonetes. De modo notável, um bastonete pode responder a um único fóton, e o cérebro necessita de menos de 10 dessas respostas para registrar a sensação de um clarão de luz.

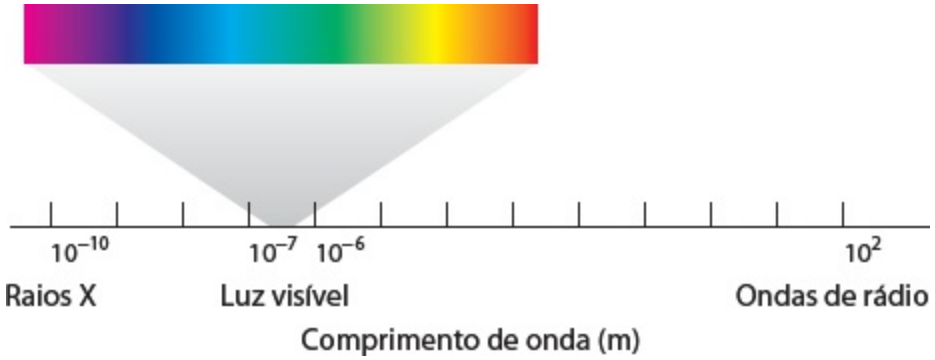
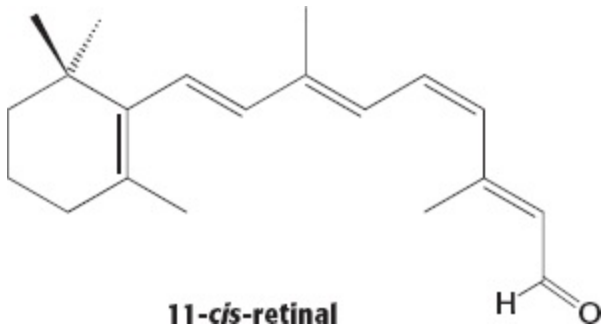


Figura 33.18 O espectro eletromagnético. A luz visível tem comprimentos de ondas entre 300 e 850 nm.



A rodopsina, um receptor 7TM especializado, absorve a luz visível

Os bastonetes são estruturas finas e alongadas; o segmento externo é especializado para a fotorrecepção (Figura 33.19). Contém uma pilha de cerca de 1.000 discos, que consistem em sacos encerrados por membrana e densamente aglomerados com moléculas fotorreceptoras. A molécula fotossensível é frequentemente denominada *pigmento visual*, visto que é altamente colorida em virtude de sua capacidade de absorver a luz. A molécula fotorreceptora nos bastonetes é a *rodopsina* (Seção 14.1), que é constituída pela proteína *opsina* ligada ao 11-*cis*-retinal, um grupo prostético.

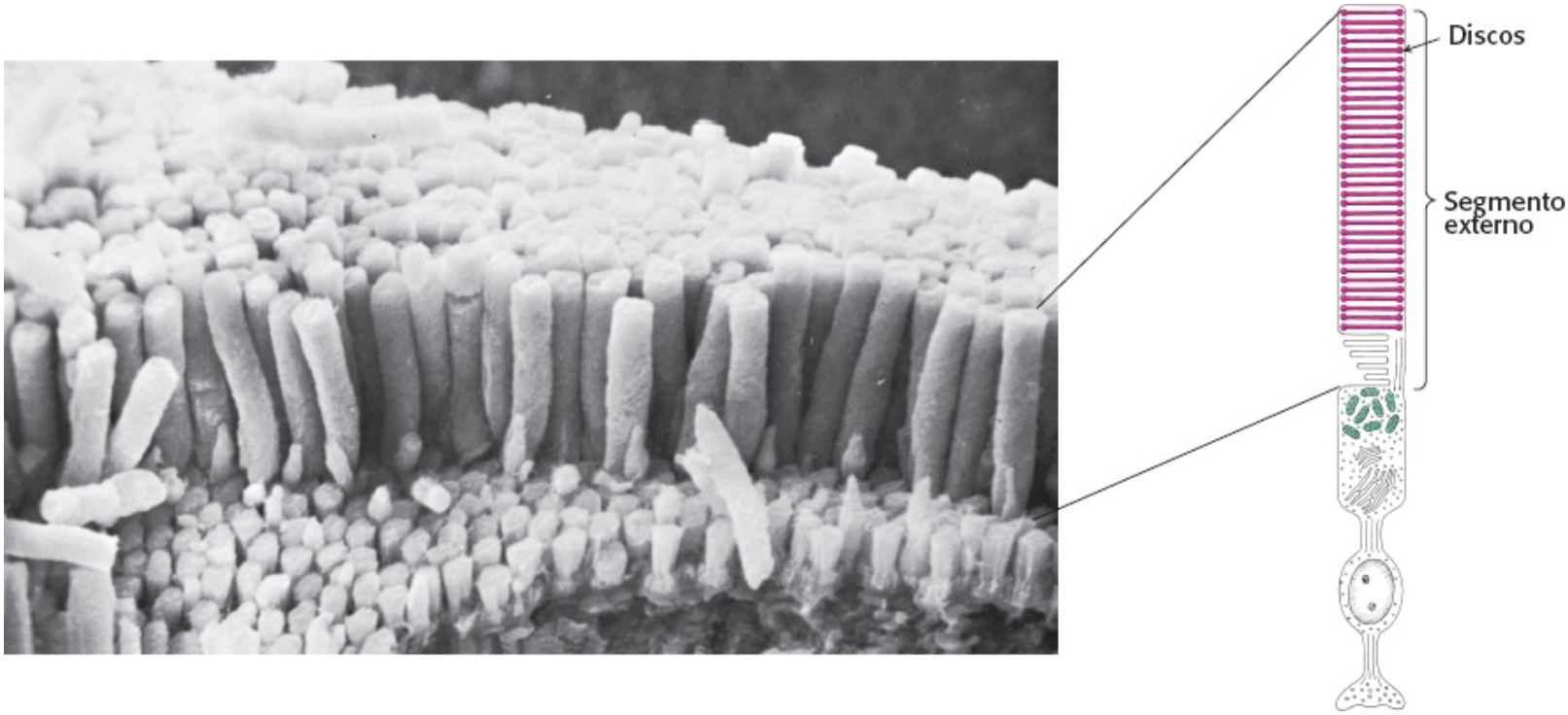


Figura 33.19 O bastonete. À esquerda, micrografia eletrônica de varredura de bastonetes da retina. À direita, representação esquemática de um bastonete. [Fotografia de cortesia do Dr. Deric Bownds].

A rodopsina absorve luz com muita eficiência no meio do espectro visível, e sua absorção é centrada em 500 nm, o que corresponde bem à emissão solar (Figura 33.20). A molécula de rodopsina absorve uma alta porcentagem de fótons do comprimento de onda correta que a atinge, conforme indicado pelo coeficiente de extinção de 40.000 M^{-1} cm^{-1} em 500 nm. O coeficiente de extinção para a rodopsina é mais do que uma ordem de magnitude maior que o do triptofano, o absorvente mais eficiente nas proteínas que carece de grupos prostéticos.

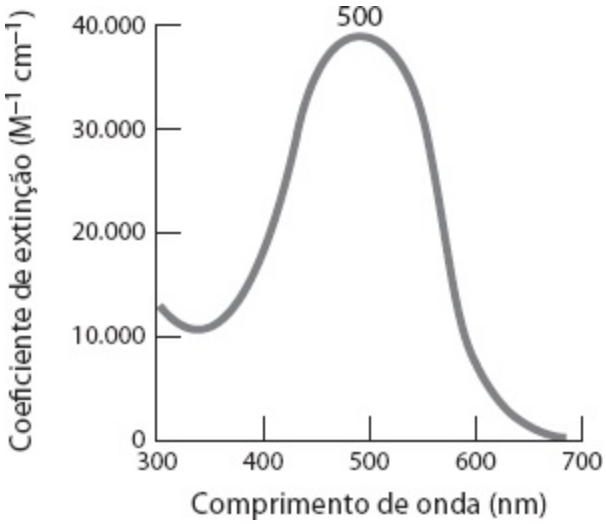


Figura 33.20 Espectro de absorção da rodopsina. Quase todos os fótons com comprimentos de onda próximos a 500 nm que atingem uma molécula de rodopsina são absorvidos.

A opsina, a proteína componente da rodopsina, é um membro da família dos receptores 7TM. Com efeito, a rodopsina foi o primeiro membro dessa família a ser purificado, seu gene foi o primeiro a ser clonado e sequenciado, e a sua estrutura tridimensional também foi a primeira a ser determinada. A cor da rodopsina e a sua responsividade à luz dependem da presença do grupo de absorção de luz (*cromóforo*), o 11-*cis*-retinal. Esse composto é um poderoso absorvente de luz por ser um polieno; suas seis ligações simples e duplas alternadas constituem uma longa rede insaturada de elétrons. Convém lembrar que a alternância de ligações simples e ligações duplas contribui para as propriedades cromóforas da clorofila (Seção 19.2). O grupo aldeído do 11-*cis*-retinal forma uma base de Schiff (Figura 33.21) com o grupo ε-amino do resíduo de lisina 296, que está situado no centro da sétima hélice transmembranar. O retinal livre tem uma absorção máxima em 370 nm e o seu produto de adição base de Schiff não protonada absorve em 380 nm, enquanto a base de Schiff protonada tem uma absorção em 440 nm ou em comprimento de ondas maiores. Por conseguinte, *a absorção máxima em 500 nm para a rodopsina sugere fortemente que a base de Schiff é protonada;* interações adicionais com a opsina deslocam a absorção máxima mais para o vermelho. A carga positiva da base de Schiff protonada é compensada pela carga negativa do glutamato 113 localizado na hélice 2; o resíduo de glutamato aproxima-se estreitamente da ligação lisina-retinal na estrutura tridimensional da rodopsina.

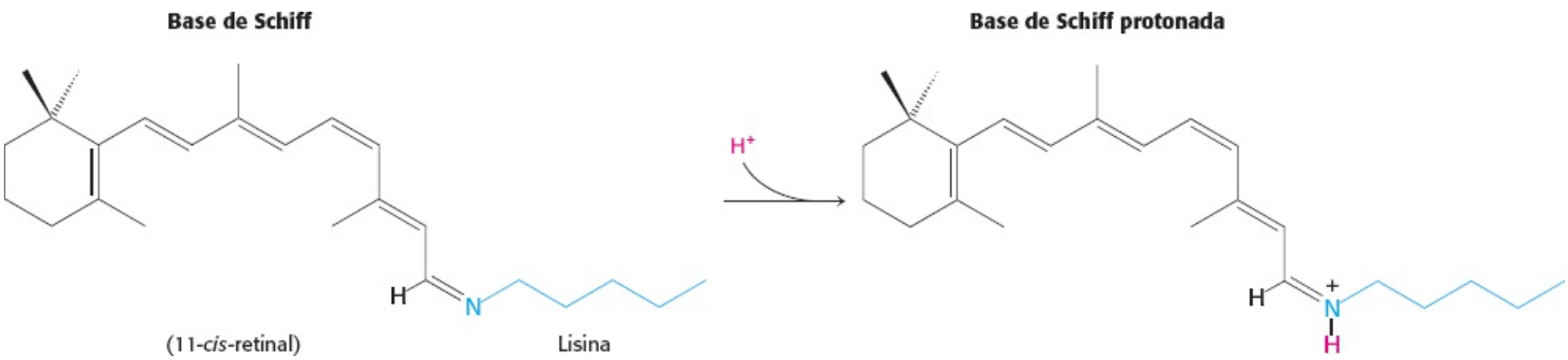


Figura 33.21 Ligação retinal-lisina. O retinal é ligado à lisina 296 na opsina por uma ligação de base de Schiff. No estado em repouso da rodopsina, essa base de Schiff está protonada.

A absorção de luz induz uma isomerização específica do 11-*cis*-retinal ligado

Como a absorção de luz pela base de Schiff do retinal gera um sinal? George Wald e colaboradores descobriram que *a absorção de luz resulta na isomerização do grupo 11-cis-retinal da rodopsina em sua forma todo*-trans (Figura 33.22). Essa isomerização faz com que o átomo de nitrogênio da base de Schiff se mova em aproximadamente 5 Å, supondo que o anel de ciclo-hexano do grupo retinal permaneça fixo. Em essência, *a energia luminosa de um fóton é convertida em movimento atômico*. A mudança nas posições dos átomos, como a ligação de um ligante a outros receptores 7TM desencadeia uma série de eventos que levem ao fechamento de canais iônicos e à produção de um impulso nervoso.

A isomerização da base de Schiff do retinal ocorre dentro de poucos picossegundos após a absorção de um fóton. O produto inicial, denominado *batorrodopsina*, contém um grupo todo-*trans*-retinal sob tensão. Dentro de aproximadamente 1 ms, esse intermediário é convertido, por meio de vários intermediários adicionais, em *metarrodopsina II*. Na metarrodopsina II, a base de Schiff é desprotonada, e a proteína opsina sofre uma reorganização significativa.

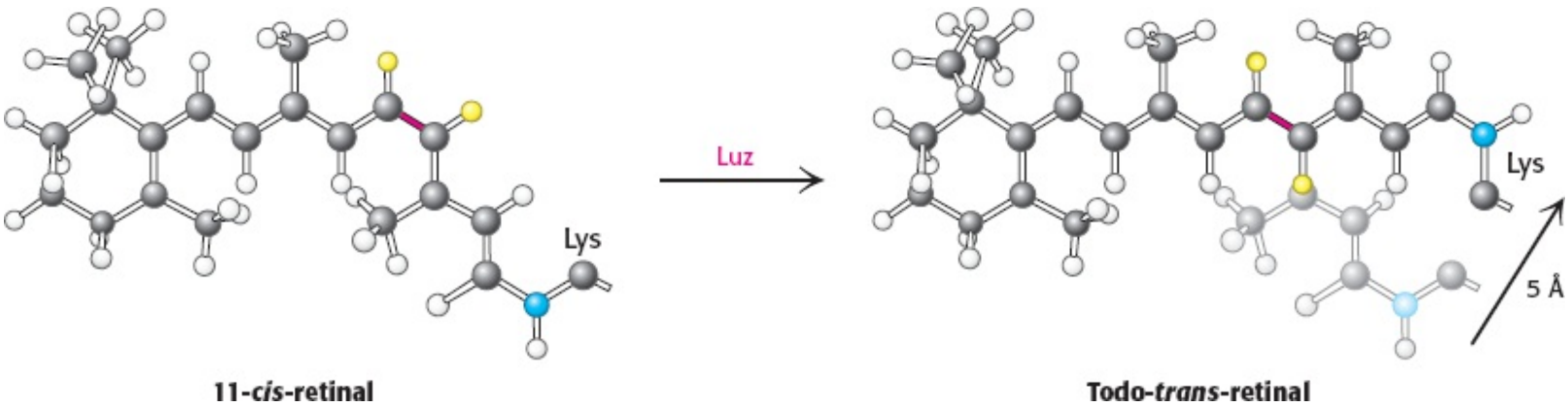


Figura 33.22 Movimento atômico no retinal. O átomo de nitrogênio na base de Schiff move-se 5 Å em consequência da isomerização induzida pela luz do11-*cis*-retinal em todo-*trans*-retinal por rotação em torno da ligação mostrada em vermelho.

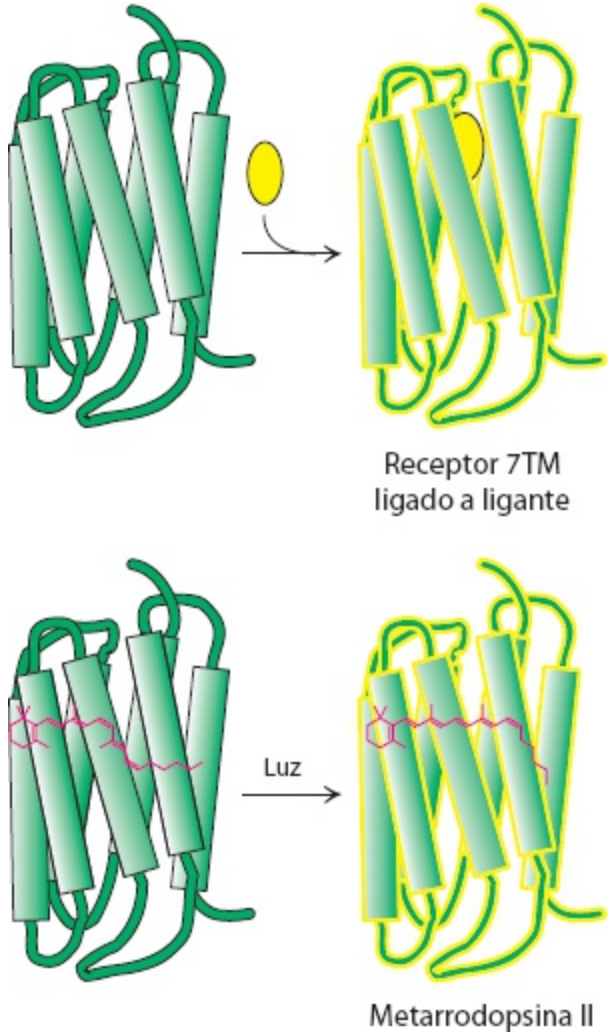


Figura 33.23 Receptores 7TM análogos. A conversão da rodopsina em metarrodopsina II ativa uma via de sinalização análoga à ativação induzida pela ligação de outros receptores 7TM a ligantes apropriados.

A metarrodopsina II (também designada como R*) é análoga ao estado ligado dos receptores 7TM, como o receptor β_2-adrenérgico (Seção 14.1) e os receptores odoríferos e gustativos discutidos anteriormente (Figura 33.23). À semelhança desses receptores, essa forma de rodopsina ativa uma proteína G heterotrimérica que propaga o sinal. A proteína G associada à rodopsina é denominada *transducina*. A metarrodopsina II desencadeia a troca de GDP por GTP pela subunidade α da transducina (Figura 33.24). Com a ligação do GTP, as subunidades β da transducina são liberadas, e a subunidade α ativa uma *cGMP fosfodiesterase* por meio de sua ligação a uma subunidade inibitória, removendo-a. A fosfodiesterase ativada é uma enzima potente que hidrolisa rapidamente o cGMP a GMP. A redução da concentração de cGMP causa o fechamento dos canais iônicos regulados por cGMP, levando à hiperpolarização da membrana e à sinalização neuronal. *Em cada etapa desse processo, o sinal inicial – a absorção de um único fóton – é amplificado, levando a uma hiperpolarização da membrana suficiente para resultar em sinalização.*

A redução do nível de cálcio induzida pela luz coordena a recuperação

Como já vimos, o sistema visual responde a mudanças de luz e de cor em poucos milissegundos, rápido o suficiente para que possamos perceber um movimento contínuo de quase 1.000 quadros por segundo. Para obter uma resposta rápida, o sinal também precisa ser interrompido rapidamente, e o sistema precisa retornar a seu estado inicial. Em primeiro lugar, a rodopsina ativada deve ser

impedida de continuar a ativar a transducina. A *rodopsina quinase* catalisa a fosforilação da extremidade carboxiterminal da R* em múltiplos resíduos de serina e treonina. A *arrestina*, uma proteína inibitória, liga-se então à R* fosforilada e impede qualquer interação adicional com a transducina.

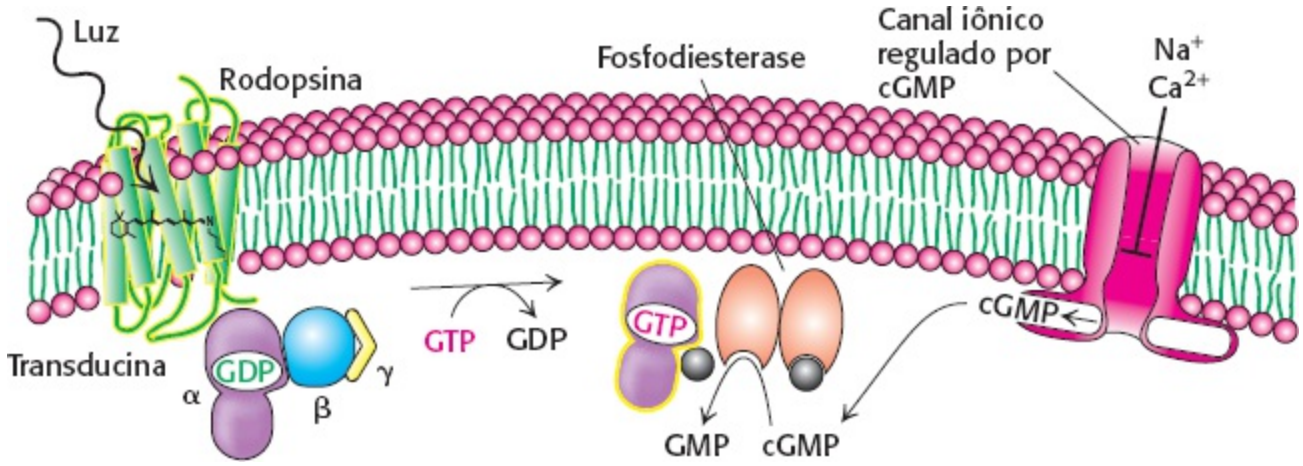


Figura 33.24 Transdução de sinais visuais. A ativação da rodopsina induzida pela luz provoca a hidrólise do cGMP, o que, por sua vez, leva ao fechamento do canal iônico e ao início de um potencial de ação.

Em segundo lugar, a subunidade α da transducina precisa retornar a seu estado inativo para impedir qualquer sinalização adicional. Como outras proteínas G, a subunidade α exibe atividade de GTPase integrante, que hidrolisa o GTP ligado a GDP. A hidrólise ocorre em menos de um segundo quando a transducina está ligada à fosfodiesterase. A forma da transducina com GDP deixa então a fosfodiesterase e volta a se associar às subunidades βγ, e a fosfodiesterase retorna a seu estado inativo. Em terceiro lugar, o nível de cGMP precisa ser elevado para reabrir os canais iônicos regulados por cGMP. *A ação da guanilato ciclase é responsável por essa terceira etapa, sintetizando cGMP a partir de GTP.*

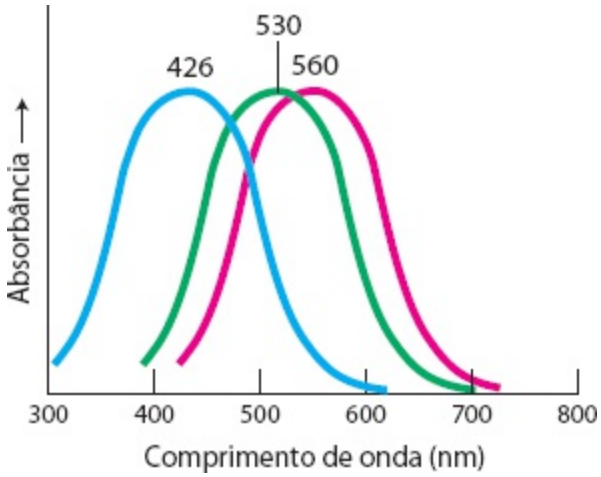
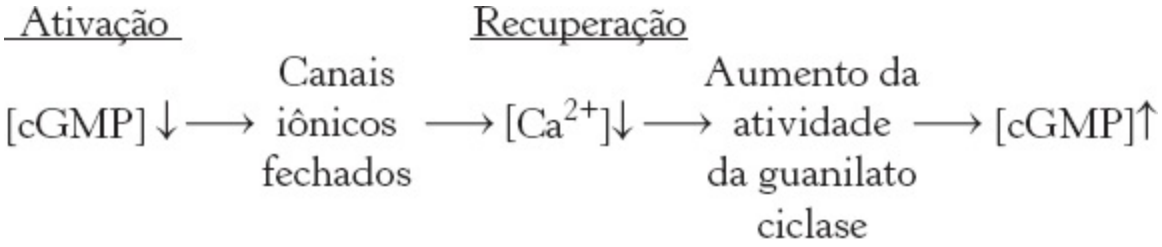


Figura 33.25 Espectros de absorção de pigmentos dos cones. Espectros de absorção do pigmento visual do cone responsável pela visão em cores.

O íon cálcio desempenha um papel essencial no controle da guanilato ciclase, visto que inibe acentuadamente a atividade da enzima. No escuro, o Ca^{2+}, bem como o Na^+, entra no segmento externo do bastonete através dos canais regulados por cGMP. O influxo dos íons cálcio é equilibrado pelo seu efluxo por meio de um trocador, um sistema de transporte que utiliza o fluxo

termodinamicamente favorável de quatro íons Na^+ para dentro da célula e um íon K^+ para fora, expulsando um íon Ca^{2+}. Após a iluminação, cessa a entrada de Ca^{2+} através dos canais regulados por cGMP, porém a sua exportação pelo trocador continua. Por conseguinte, o nível citoplasmático de Ca^{2+} cai de 500 nM para 50 nM após a iluminação. Esse declínio estimula acentuadamente a guanilato ciclase, restaurando rapidamente a concentração de cGMP para reabrir os canais regulados por cGMP.



Ao controlar a taxa de síntese de cGMP os níveis de Ca^{2+} dirigem a velocidade com que o sistema é restaurado a seu estado inicial.

A visão de cores é mediada por três receptores de cones que são homólogos à rodopsina

À semelhança dos bastonetes, os cones contêm pigmentos visuais. Como a rodopsina, essas proteínas fotorreceptoras são membros da família de receptores 7TM e utilizam o 11-*cis*-retinal como seu cromóforo. Nos cones humanos, existem três proteínas fotorreceptoras distintas, com absorção máxima em 426, 530 e cerca de 560 nm (Figura 33.25). *Essas absorbâncias correspondem (e, de fato, definem) as regiões azul, verde e vermelho do espectro*. Convém lembrar que a absorção máxima para a rodopsina é de 500 nm.

As sequências de aminoácidos dos fotorreceptores dos cones foram comparadas umas com as outras e com a rodopsina. O resultado é notável. Cada um dos fotorreceptores dos cones tem uma identidade de sequência com a rodopsina de aproximadamente 40%. De modo semelhante, o fotorreceptor de azul tem 40% de identidade com cada um dos fotorreceptores de verde e vermelho. Entretanto, os fotorreceptores de verde e de vermelho têm uma identidade de >95% entre si, diferindo apenas em 15 das 364 posições (Figura 33.26).

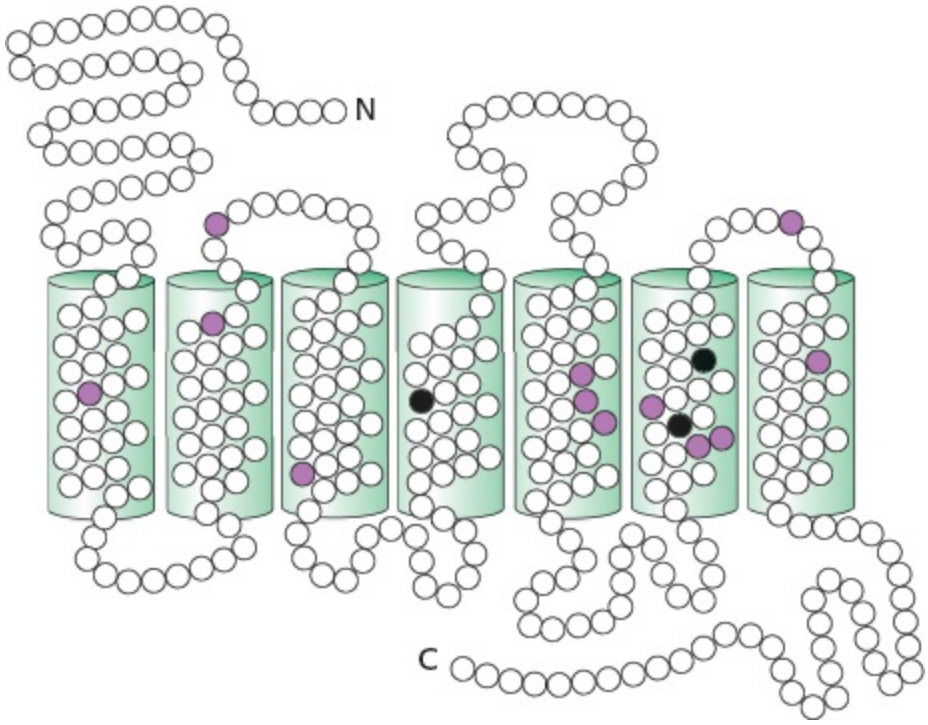


Figura 33.26 Comparação das sequências de aminoácidos dos fotorreceptores de verde e de vermelho. Os círculos vazios correspondem a resíduos idênticos, enquanto os círculos coloridos marcam resíduos diferentes. As diferenças nas três posições em preto são responsáveis pela maior parte da diferença em seus espectros de absorção.

Essas observações constituem fontes de esclarecimentos sobre a evolução dos fotorreceptores. Em primeiro lugar, os fotorreceptores de verde e de vermelho são claramente produtos de um evento evolutivo recente (Figura 33.27). Os pigmentos para o verde e para o vermelho parecem ter divergido na linhagem dos primatas há aproximadamente 35 milhões de anos. Os mamíferos, como os cães e os camundongos que divergiram dos primatas mais cedo, têm apenas dois fotorreceptores de cones, o azul e o verde. Não são sensíveis à luz em direção à região do infravermelho como nós e não discriminam tão bem as cores. Em contrapartida, as aves, como as galinhas, apresentam um total de seis pigmentos: a rodopsina, quatro pigmentos de cones e um pigmento visual pineal, denominado *pinopsina*. As aves têm uma percepção altamente apurada das cores.

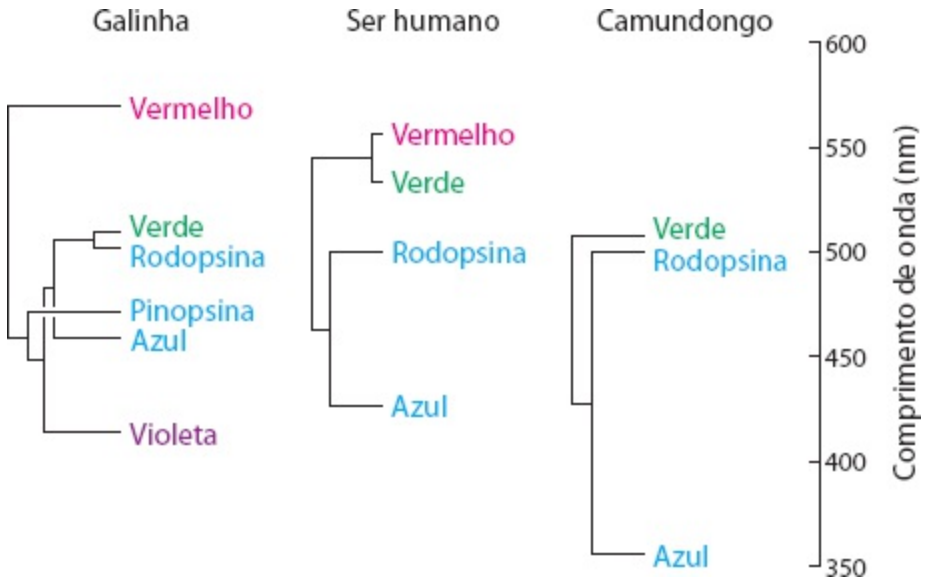


Figura 33.27 Relações evolutivas entre os pigmentos visuais. Os pigmentos visuais evoluíram por duplicação gênica ao longo de diferentes ramos da árvore volutiva animal. O comprimento dos ramos das "árvores" corresponde à porcentagem de divergência dos aminoácidos. [De J. Nathans. *Neuron* 24:299-312, 1999; com autorização da Cell Press].

Em segundo lugar, o alto nível de semelhança entre os pigmentos verde e vermelho possibilitou a identificação dos resíduos de aminoácidos específicos responsáveis pelo ajuste do espectro. Três resíduos (nas posições 180, 277 e 285) são responsáveis pela maioria das diferenças entre os pigmentos para verde e para vermelho. No pigmento para verde, esses resíduos consistem em alanina, fenilalanina e alanina, respectivamente; no pigmento para vermelho, consistem em serina, tirosina e treonina. Um grupo hidroxila foi acrescentado a cada aminoácido no pigmento para vermelho. Os grupos hidroxila podem interagir com o estado fotoexcitado do retinal e diminuir a sua energia, levando a um deslocamento para a região de menor energia (vermelho) do espectro.

Recombinação homóloga

A troca de segmentos do DNA com semelhança substancial de sequência em posições equivalentes entre cromossomos.

Rearranjos nos genes para os pigmentos verde e vermelho levam ao daltonismo

Os genes para os pigmentos verde e vermelho estão adjacentes um ao outro no cromossomo X humano. Esses genes apresentam mais de 98% de identidade na sua sequência de nucleotídios, incluindo íntrons e regiões não traduzidas, bem como a região de codificação de proteína. Regiões com essa alta semelhança são muito suscetíveis a uma recombinação homóloga desigual.

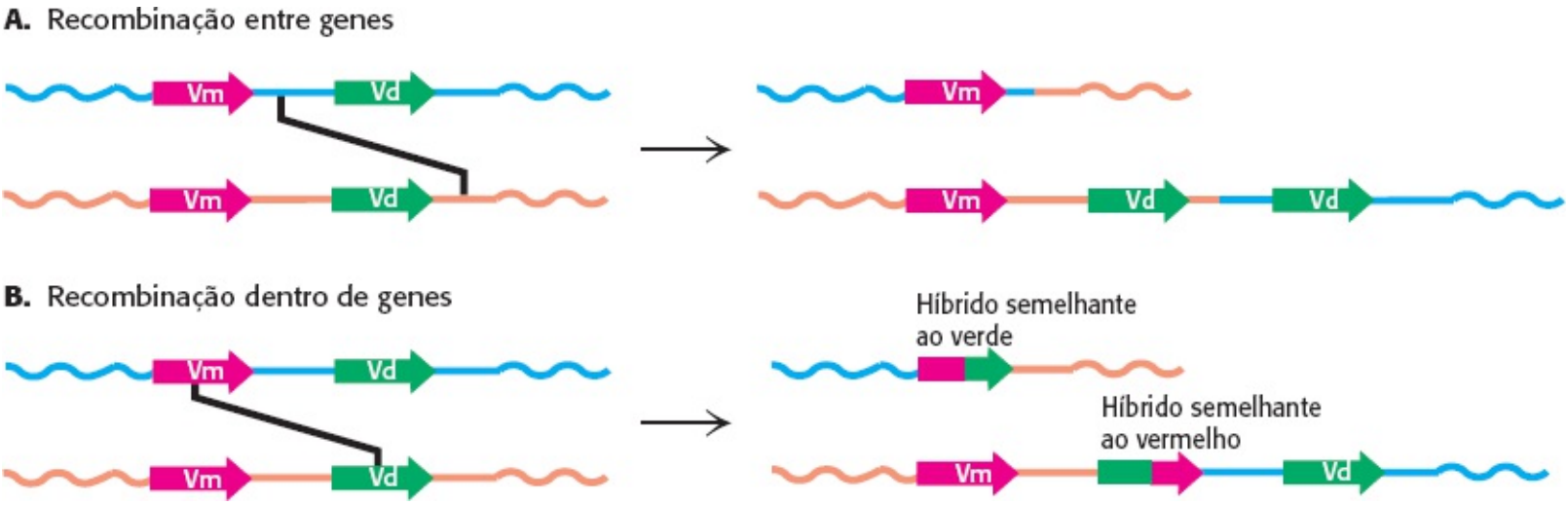


Figura 33.28 Vias de recombinação que levam ao daltonismo. Os rearranjos no processo de replicação do DNA podem levar (**A**) à perda de genes de pigmento visual ou (**B**) à formação de genes de pigmento híbrido, que codificam fotorreceptores com espectros de absorção anormais. Como os aminoácidos mais importantes para determinar os espectros de absorção estão na metade carboxiterminal de cada proteína fotorreceptora, a parte do gene que codifica essa região afeta mais intensamente as características de absorção dos receptores híbridos. [De Nathans. *Neuron* 24:299-312, 1999; com autorização da Cell Press.]

A recombinação pode ocorrer entre regiões transcritas do gene ou dentro delas (Figura 33.28). Se a recombinação ocorrer entre regiões transcritas, os cromossomos produzidos diferirão no número de genes de pigmento que possuem. Um cromossomo perderá um gene e, portanto, poderá não ter o gene, por exemplo, para o pigmento verde; o outro cromossomo adquirirá um gene. De acordo com esse cenário, cerca de 2% dos cromossomos X humanos apresentam apenas um único gene de pigmento de cor; aproximadamente 20% têm 2; 50%, 3; 20%, 4; e 5%, 5 ou mais. Um indivíduo que carece do gene para o pigmento verde terá dificuldade em distinguir as cores vermelha e verde, uma

característica da forma mais comum de daltonismo. Aproximadamente 5% dos homens têm essa forma de daltonismo. A recombinação também pode ocorrer dentro das unidades de transcrição, resultando em genes que codificam híbridos de fotorreceptores de verde e de vermelho. A absorção máxima desse híbrido situa-se entre a dos pigmentos vermelho e verde. Uma pessoa com esses genes híbridos que também carece de um gene para o pigmento vermelho ou verde funcional tampouco discrimina bem as cores.

33.4 A audição depende da detecção rápida de estímulos mecânicos

A audição e o tato baseiam-se na detecção de estímulos mecânicos. Embora as proteínas desses sentidos não tenham sido tão bem caracterizadas quanto as dos sentidos já discutidos, estudos anatômicos, fisiológicos e biofísicos elucidaram os processos fundamentais. *Um importante indício para o mecanismo da audição é a sua velocidade*. Ouvimos frequências que variam de 200 a 20.000 Hz (ciclos por segundo), correspondendo a tempos de 5 a 0,05 ms. Além disso, nossa capacidade de localizar fontes de som, que é uma das funções mais importantes da audição, depende da capacidade de detectar um intervalo de tempo entre a chegada de um som a uma orelha e a sua chegada à outra. Tendo-se em vista a distância entre nossas orelhas e a velocidade do som, devemos ser capazes de perceber acuradamente diferenças de tempo de 0,7 ms. Com efeito, os seres humanos são capazes de localizar fontes sonoras associadas a intervalos de tempo de apenas 0,02 ms. Essa alta resolução de tempo significa que a audição deve empregar mecanismos de transdução direta que não dependem de segundos mensageiros. Convém lembrar que, na visão, para a qual a velocidade também é importante, os processos de transdução de sinais ocorrem em milissegundos.

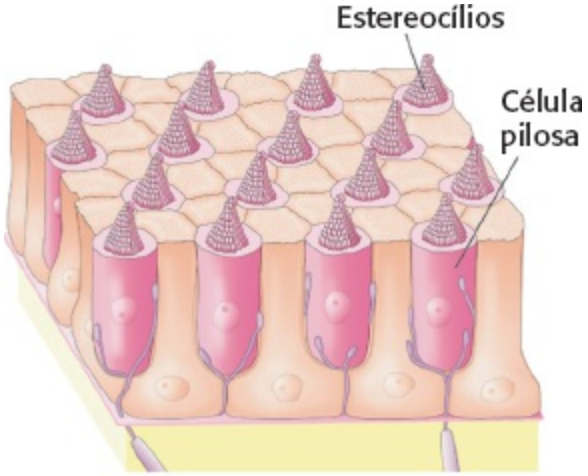


Figura 33.29 Células pilosas, os neurônios sensoriais cruciais para a audição. Esses neurônios especializados são recobertos por projeções pilosas, denominadas estereocílios, que são responsáveis pela detecção de vibrações muito sutis. [De A. J. Hudspeth. *Nature* 341:397-404, 1989.]

As células pilosas utilizam um feixe conectado de estereocílios para detectar pequenos movimentos

As ondas sonoras são detectadas dentro da cóclea da orelha interna. A *cóclea* é um saco membranoso cheio de líquido, espiralado como um caracol. A detecção primária é efetuada por neurônios especializados dentro da cóclea, denominados *células pilosas* (Figura 33.29). Cada cóclea contém

aproximadamente 16.000 células pilosas, e cada uma delas contém um feixe em forma hexagonal de 20 a 300 projeções pilosas, denominadas *estereocílios* (Figura 33.30). Estes estereocílios têm comprimentos variados no feixe. A deflexão mecânica do feixe piloso, que ocorre quando uma onda sonora chega à orelha, cria uma mudança no potencial de membrana da célula pilosa.

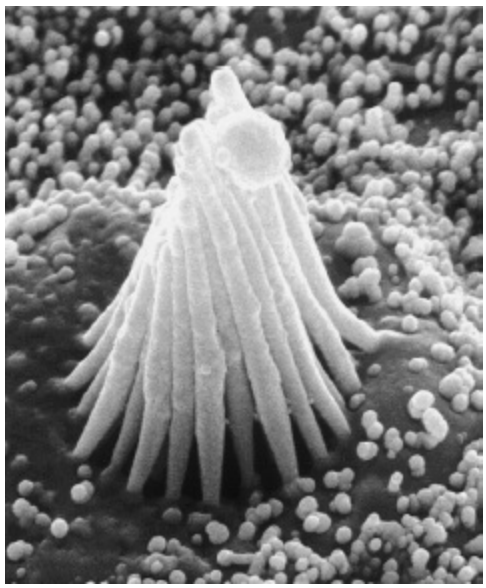


Figura 33.30 Micrografia eletrônica de um feixe piloso. [Cortesia do Dr. A. Jacobs e Dr. A. J. Hudspeth.]

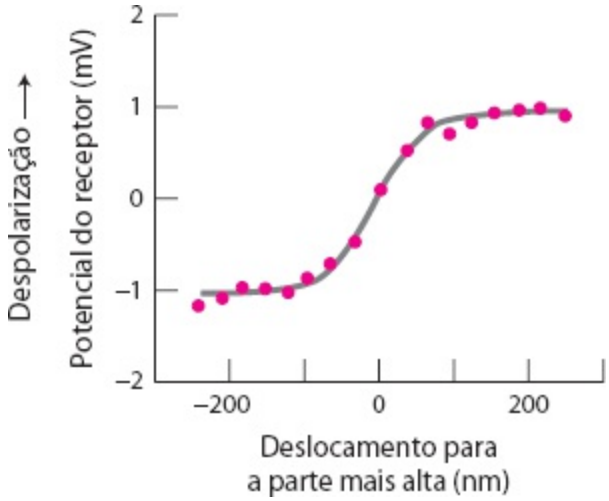


Figura 33.31 Micromanipulação de uma célula pilosa. O movimento para a parte mais alta do feixe despolariza a célula, conforme medido pelo microeletrodo. O movimento para a parte mais curta hiperpolariza a célula. O movimento lateral não tem nenhum efeito. [De A. J. Hudspeth. *Nature* 341:397-404, 1989.]

Experimentos de micromanipulação testaram diretamente a conexão entre a estimulação mecânica e o potencial de membrana. O deslocamento em direção à parte mais alta do feixe piloso resulta em despolarização da célula pilosa, enquanto o deslocamento no sentido oposto resulta em hiperpolarização (Figura 33.31). O movimento perpendicular ao gradiente de comprimento dos cílios não produz qualquer alteração no potencial de repouso. De modo notável, *o deslocamento de feixe piloso em apenas 3 Å (0,3 nm) resulta em uma mudança mensurável (e funcionalmente importante) no potencial de membrana*. Esse movimento de 0,003 grau corresponde a um movimento de uma polegada (2,54 cm) do topo do edifício Empire State Building.

Como o movimento do feixe piloso cria uma mudança no potencial de membrana? A resposta rápida, dentro de microssegundos, sugere que o movimento do feixe piloso atua diretamente sobre

canais iônicos. Uma importante observação é que os estereocílios adjacentes estão ligados por filamentos individuais, denominados *ligações de ponta (tip links)* (Figura 33.32).

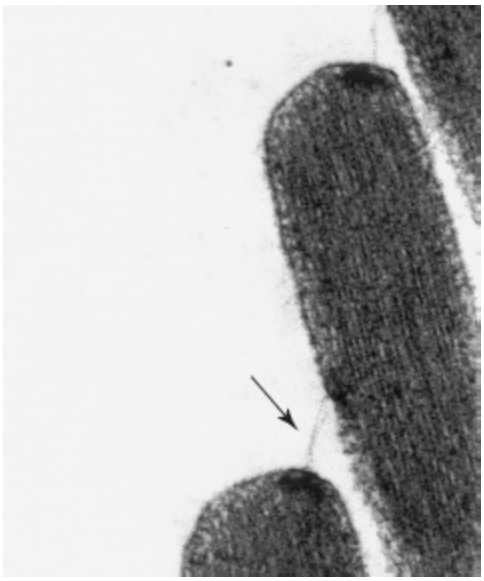


Figura 33.32 Micrografia eletrônica de ligações de ponta. A ligação de ponta entre duas fibras pilosas está indicada por uma seta. [Cortesia do Dr. A. Jacobs e Dr. A.J. Hudspeth.]

A presença dessas ligações de ponta sugere um modelo mecânico simples para a transdução pelas células pilosas (Figura 33.33). As ligações de ponta estão acopladas a canais iônicos nas membranas dos estereocílios, que são regulados por estresse mecânico. Na ausência de estímulo, aproximadamente 15% desses canais estão abertos. Quando o feixe piloso é deslocado para a sua parte mais alta, os estereocílios deslizam uns sobre os outros, e a tensão nas ligações de ponta aumenta, causando a abertura de canais adicionais. O fluxo de íons através dos canais recém-abertos despolariza a membrana. Por outro lado, se o seu deslocamento ocorre no sentido oposto, a tensão nas ligações de ponta diminui, verifica-se o fechamento dos canais abertos, e a membrana hiperpolariza. *Por conseguinte, o movimento mecânico do feixe piloso é convertido diretamente em fluxo de corrente pela membrana da célula pilosa.*

Foram identificados canais mecanossensoriais em *Drosophila* e vertebrados

Foram realizadas pesquisas à procura de canais iônicos que respondem a impulsos mecânicos em uma variedade de organismos. *Drosophila* tem cerdas sensoriais utilizadas para a detecção de pequenas correntes de ar. Essas cerdas respondem ao deslocamento mecânico de modo semelhante às células pilosas; o deslocamento de uma cerda em um sentido leva a uma corrente transmembranar substancial. Cepas de moscas-das-frutas mutantes que exibem movimento descoordenado e desajeitado foram examinadas quanto às suas respostas eletrofisiológicas ao deslocamento das cerdas sensoriais. Em um conjunto de cepas, foi constatada uma acentuada redução das correntes transmembranares. Foi observado que o gene mutante nessas cepas codifica uma proteína de 1.619 aminoácidos denominada NompC (do inglês, *no mechanoreceptor potential*, que significa "nenhum potencial mecanorreceptor").

Os 469 aminoácidos carboxiterminais da NompC assemelham-se a uma classe de proteínas de canais iônicos, denominadas canais de potencial de receptor transitório (TRP, *do inglês transient receptor potential*). Essa região inclui seis supostas hélices transmembranares, com uma região

semelhante a um poro entre a quinta e a sexta hélice. Os 1.150 aminoácidos aminoterminais são constituídos quase exclusivamente de 29 *repetições de anquirina* (Figura 33.34). As repetições de anquirina são motivos estruturais, que consistem em uma alça em grampo seguida de uma hélice-volta-hélice. É importante ressaltar que, em outras proteínas, as regiões com disposições desses motivos em série medeiam interações de proteína-proteína, sugerindo que essas disposições acople os movimentos de outras proteínas à atividade do canal NompC.

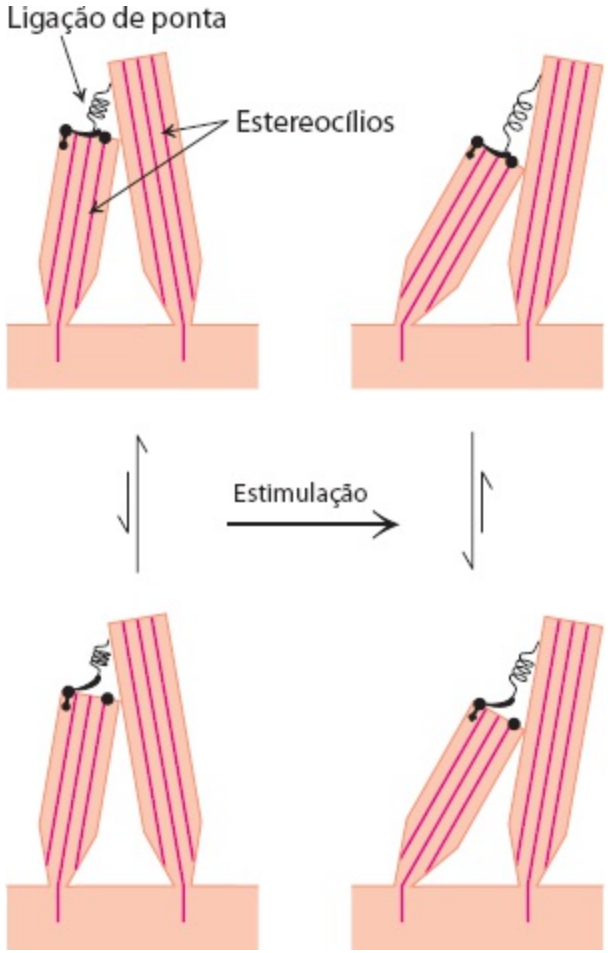


Figura 33.33 Modelo de transdução da célula pilosa. Quando o feixe piloso se inclina para a parte mais alta, a ligação de ponta traciona um canal iônico e o abre. O movimento no sentido oposto relaxa a tensão na ligação de ponta, aumentando a probabilidade de fechamento de qualquer canal aberto. [De A. J. Hudspeth. *Nature* 341:397-404, 1989.]

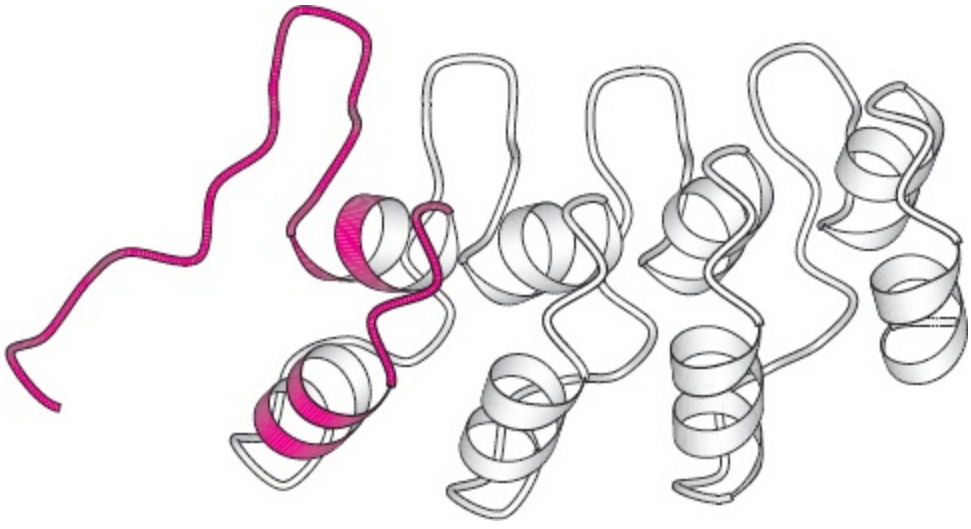


Figura 33.34 Estrutura repetida da anquirina. Um domínio de anquirina é mostrado em vermelho nessa série de quatro repetições de anquirina. Observe a alça em grampo seguida de um motivo de hélice-volta-hélice na unidade de anquirina

em vermelho. Os domínios da anquirina interagem com outras proteínas, principalmente por meio de suas alças. [Desenhada a partir de 1AWC.pdb.]

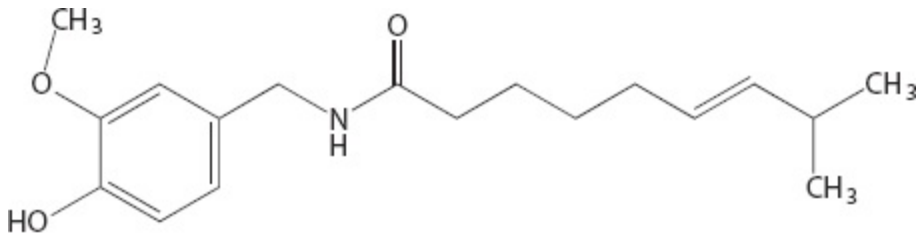
Foi identificado um candidato a pelo menos um componente do canal mecanossensorial envolvido na audição. A proteína, designada como TRPA1, é um membro da família do canal TRP. A sequência da TRPA1 também inclui 17 repetições de anquirina. A TRPA1 é expressa em células pilosas, particularmente perto de suas pontas, e provavelmente constitui pelo menos um componente do canal mecanossensorial que é fundamental para a audição. Outros estudos estão em andamento para confirmar e aprofundar essa interessante descoberta.

33.5 O tato inclui a percepção de pressão, temperatura e outros fatores

À semelhança do paladar, o tato é uma combinação de sistemas sensoriais que são expressos em um órgão comum – neste caso, a pele. A detecção de pressão e a detecção da temperatura são dois componentes essenciais. Os canais de Na^+ sensíveis à amilorida, homólogos aos do paladar, parecem desempenhar um papel. Outros sistemas são responsáveis pela detecção de estímulos dolorosos, como temperatura elevada, ácidos ou certas substâncias químicas específicas. Embora ainda não compreendamos sobre este sistema tanto quanto sobre os outros sistemas sensoriais, pesquisas recentes revelaram a existência de uma relação fascinante entre a sensação de dor e o paladar, uma relação bem conhecida de qualquer pessoa que já tenha comido um alimento "apimentado".

Estudos da capsaicina revelam um receptor para a percepção de altas temperaturas e outros estímulos dolorosos

Nosso sentido do tato está intimamente conectado com a sensação de dor. Neurônios especializados, denominados *nociceptores*, transmitem sinais da pele para os centros de processamento da dor na medula espinal e no cérebro, em resposta ao início de um dano tecidual. Qual é a base molecular para a sensação da dor? Um indício curioso veio da constatação de que a *capsaicina*, a substância química responsável pelo sabor "quente" dos alimentos picantes, ativa os nociceptores.



Capsaicina

As primeiras pesquisas sugeriram que a capsaicina poderia atuar abrindo os canais iônicos que são expressos nos nociceptores. Por conseguinte, uma célula que expresse o receptor de capsaicina deve captar cálcio quando tratada com a molécula. Essa observação levou ao isolamento do *receptor de capsaicina* com o uso de cDNA das células que expressam esse receptor. Essas células foram detectadas pela sua fluorescência quando saturadas com Fura-2, um composto sensível ao cálcio, e tratadas, em seguida, com capsaicina ou moléculas relacionadas. As células que expressam o receptor de capsaicina, que é denominado VR1 (abreviatura de *r*eceptor *v*aniloide 1), respondem à capsaicina abaixo de uma concentração de 1 μM. A sequência deduzida de 838 resíduos do VR1

revelou que esse receptor é um membro da família dos canais de TRP (Figura 33.35). A região aminoterminal do VR1 inclui três repetições de anquirina.

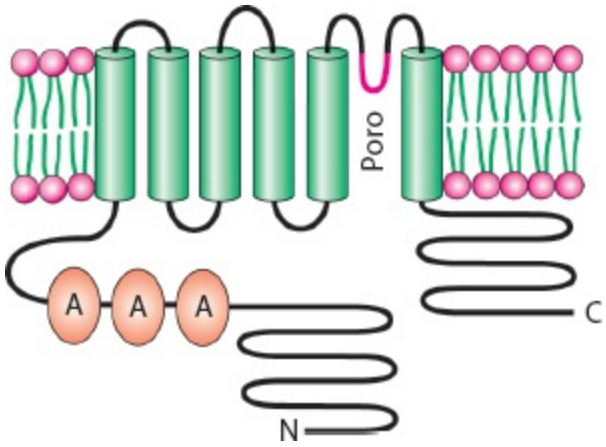


Figura 33.35 Topologia da membrana deduzida para o VR1, o receptor de capsaicina. O local proposto do poro da membrana está indicado em vermelho, enquanto as três repetições de anquirina (A) são mostradas em laranja. O receptor ativo compreende quatro dessas subunidades. [De M. J. Caterina *et al. Nature* 389:816-824, 1997.]

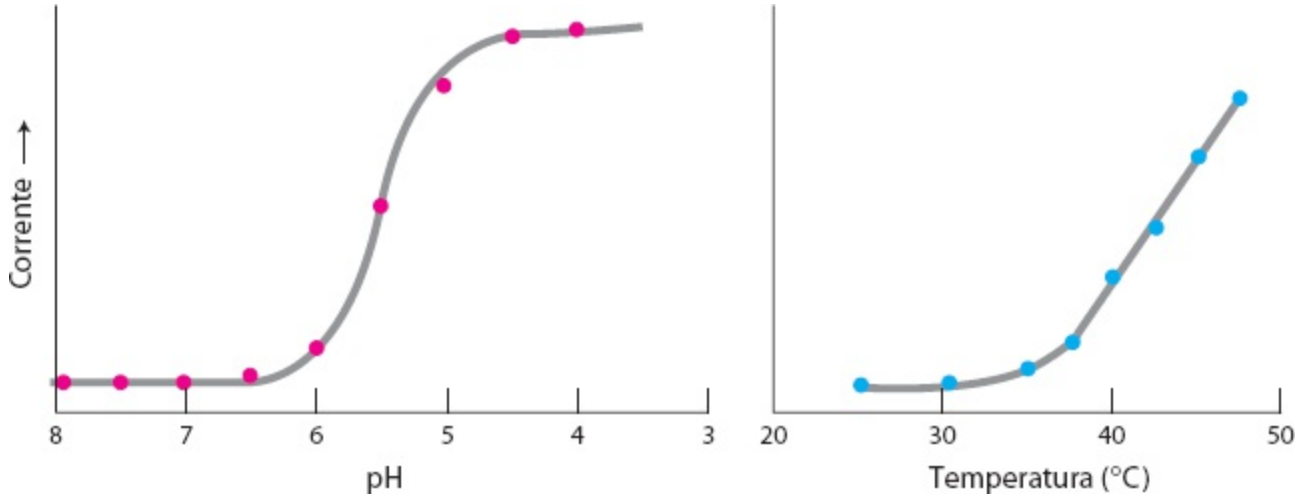


Figura 33.36 Resposta do receptor de capsaicina ao pH e à temperatura. A capacidade desse receptor de responder ao ácido e a uma temperatura elevada ajuda a detectar situações potencialmente nocivas. [De M. Tominaga *et al.* Neuron 21:531-543, 1998.]

As correntes através do VR1 também são induzidas por temperaturas acima de 40°C e pela exposição a ácido diluído, com ponto médio de ativação em pH de 5,4 (Figura 33.36). As temperaturas e a acidez nessas faixas estão associadas a infecção e dano celular. As respostas à capsaicina, à temperatura e à acidez não são independentes. A resposta ao calor é maior em pH mais baixo, por exemplo. Assim, *o VR1 atua para integrar vários estímulos nocivos*. Sentimos essas respostas como dor e agimos para evitar condições potencialmente destrutivas que causam sensação desagradável. Estudos com camundongos que não expressam o VR1 confirmam este fato; esses camundongos não se importam com alimentos contendo altas concentrações de capsaicina e, com efeito, respondem menos do que os camundongos-controle ao calor normalmente nocivo. Plantas como a pimenta-malagueta provavelmente desenvolveram a capacidade de sintetizar capsaicina e outros compostos "quentes" para se proteger de serem consumidas por mamíferos. As aves, que desempenham um papel benéfico na propagação das sementes de pimenta em um novo território, não parecem responder à capsaicina.

Graças à sua capacidade de estimular o VR1, a capsaicina é usada no tratamento da dor na artrite, neuralgia e outras neuropatias. Como um composto que induz dor pode ajudar no seu alívio? A exposição crônica à capsaicina hiperestimula os neurônios transmissores de dor, levando à sua dessensibilização.

Mais sistemas sensoriais ainda devem ser estudados

Podem existir outros sentidos sutis que sejam capazes de detectar sinais ambientais que irão influenciar o nosso comportamento. A base bioquímica desses sentidos está sendo atualmente pesquisada. Um desses sentidos é a nossa capacidade de responder, frequentemente sem a nossa percepção, a sinais químicos denominados feromônios, liberados por outras pessoas. Outro é o nosso sentido de tempo, que se manifesta nos ritmos diários (circadianos) de atividade e repouso. As mudanças diárias na exposição à luz influenciam fortemente esses ritmos. Os fundamentos dessas sensações foram revelados em outros organismos, e os futuros estudos deverão revelar até que ponto esses mecanismos também se aplicam aos seres humanos.

Resumo

A olfação, a gustação, a visão, a audição e o tato baseiam-se em vias de transdução de sinais, que são ativadas por sinais provenientes do ambiente. Esses sistemas sensoriais funcionam de modo semelhante às vias de transdução de sinais de muitos hormônios. Essas vias de sinalização intercelulares parecem ter sido adotadas e modificadas para processar informações do ambiente.

33.1 Uma ampla variedade de compostos orgânicos é detectada pela olfação

O sentido do olfato ou olfação é notável pela sua especificidade; por exemplo, pode distinguir estereoisômeros de pequenos compostos orgânicos como aromas distintos. Os receptores 7TM que detectam essas substâncias odoríferas operam em conjunto com a $G_{(olf)}$, uma proteína G que ativa uma cascata de cAMP, resultando na abertura de um canal iônico e na geração de um impulso nervoso. Uma característica notável do sistema olfatório é a sua capacidade de detectar uma ampla gama de substâncias odoríferas. Cada neurônio olfatório expressa apenas um tipo de receptor e conecta-se a uma região particular do bulbo olfatório. Os odores são decodificados por um mecanismo combinatório: cada substância odorífera ativa uma certa quantidade de receptores, cada um em grau diferente, e os receptores são ativados, em sua maioria, por mais de uma substância odorífera.

33.2 O paladar é uma combinação de sentidos que funcionam por mecanismos diferentes

Podemos detectar apenas cinco sabores: amargo, doce, salgado, azedo e umami. As vias de transdução que detectam o sabor são, entretanto, diversas. Os sabores amargo, doce e umami são percebidos por receptores 7TM, que atuam por meio de uma proteína G especial, denominada gustducina. Os sabores salgado e azedo atuam diretamente através de canais de membrana. O sabor salgado é detectado pela passagem através de canais de Na^+, enquanto o azedo resulta dos efeitos dos íons hidrogênio em vários tipos de canais. O ponto final é o

mesmo em todos os casos – a polarização da membrana que resulta na transmissão de um impulso nervoso.

33.3 As moléculas fotorreceptoras nos olhos detectam a luz visível

A visão é, talvez, o mais bem compreendido dos sentidos. Existem duas classes de células fotorreceptoras: os cones, que respondem à luz intensa e às cores, e os bastonetes, que só respondem à pouca luz. O fotorreceptor nos bastonetes é a rodopsina, um receptor 7TM que é um complexo da proteína opsina e um cromóforo 11-*cis*-retinal. A absorção de luz pelo 11-*cis*-retinal modifica a sua estrutura em todo-*trans*-retinal, acionando uma via de transdução de sinais que leva à degradação do cGMP, à hiperpolarização da membrana e a um impulso nervos subsequente. A visão em cores é mediada por três fotorreceptores 7TM distintos, que empregam o 11-*cis*-retinal como cromóforo e que absorvem a luz nas partes azul, verde e vermelha do espectro.

33.4 A audição depende da detecção rápida de estímulos mecânicos

Os receptores imediatos para a audição são encontrados nas células pilosas da cóclea, que contêm feixes de estereocílios. Quando os estereocílios se movem em resposta a ondas sonoras, os canais de cátions se abrem ou se fecham, dependendo do sentido do movimento. O movimento mecânico dos cílios é convertido em fluxo de corrente e, em seguida, em um impulso nervoso.

33.5 O tato inclui a percepção de pressão, temperatura e outros fatores

O tato, que é detectado pela pele, percebe a pressão, a temperatura e a dor. Células nervosas especializadas, denominadas nociceptoras, transmitem sinais que são interpretados no cérebro como dor. Um receptor responsável pela percepção de dor foi isolado com base na sua capacidade de ligação à capsaicina, a molécula responsável pelo sabor quente do alimento picante. O receptor de capsaicina, também denominado VR1, atua como canal de cátions que inicia um impulso nervoso.

Palavras-chave

arrestina (p. 976)
bastonete (p. 974)
cGMP fosfodiesterase (p. 976)
canal de Na^+ sensível à amilorida (p. 973)
canal iônico regulado por cGMP (p. 976)
cone (p. 974)
cromóforo (p. 975)
célula pilosa (p. 979)
epitélio olfatório principal (p. 966)
esterecílio (p. 979)
$G_{(olf)}$ (p. 967)
guanilato ciclase (p. 977)
gustducina (p. 971)

ligação de ponta (p. 980)
nociceptor (p. 981)
opsina (p. 974)
receptor de capsaicina (VR1) (p. 981)
retinal (p. 974)
rodopsina (p. 974)
rodopsina quinase (p. 976)
transducina (p. 976)

Questões

1. *Olfação em vermes*. Diferentemente dos neurônios olfatórios nos sistemas de mamíferos discutidos neste capítulo, os neurônios olfatórios no nematódeo *C. elegans* expressam múltiplos receptores olfatórios. Em particular, um neurônio (denominado AWA) expressa receptores para compostos para os quais o nematódeo é atraído, enquanto um neurônio diferente (denominado AWB) expressa receptores para compostos que o nematódeo evita. Suponha que seja produzido um nematódeo transgênico, no qual um dos receptores para um odor atraente seja expresso no AWB e não no AWA. Que comportamento você esperaria na presença do odor atraente correspondente?

2. *Correspondência de substâncias odoríferas*. Uma mistura de dois dos compostos ilustrados na Figura 33.6 é aplicada a um corte de epitélio olfatório. Apenas os receptores 3, 5, 9, 12 e 13 são ativados de acordo com a Figura 33.7. Identifique os compostos prováveis na mistura.

3. *Relação temporal*. Compare os aspectos do paladar (amargo, doce, salgado, azedo) em relação a seu potencial de tempo de resolução rápido.

4. *Duas orelhas*. Nossa capacidade de determinar a direção da qual está vindo um som baseia-se, em parte, na diferença de tempo em que nossas duas orelhas detectam o som. Tendo em vista a velocidade do som (350 m s^{-1}) e a distância entre nossas orelhas (0,15 m), que diferença você espera nos tempos de chegada de um som a nossas duas orelhas? Como essa diferença é comparada com o tempo de resolução do sistema auditivo humano? Um sistema sensorial que utilizasse receptores 7TM e proteínas G seria capaz de um tempo de resolução adequado?

5. *É melhor ser amargo*. Algumas plantas não tóxicas têm sabor muito amargo para nós. Sugira uma ou mais explicações.

6. *Sobre camundongos e homens*. Nos seres humanos, o sabor umami é produzido apenas pelo glutamato e pelo aspartato. Em contrapartida, os camundongos respondem a uma quantidade muito maior de aminoácidos. Planeje um experimento para testar qual das subunidades (T1R1 ou T1R3) determina a especificidade dessa resposta. Suponha que todas as cepas de camundongos desejadas possam ser prontamente produzidas.

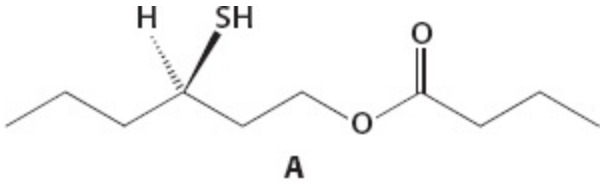
7. *Discriminação de cor*. Algumas mulheres que tiveram filhos do sexo masculino que apresentaram daltonismo demonstraram distinguir cores que não são prontamente distinguidas por outras pessoas. Proponha uma explicação.

8. *Poder combinatório*. Quantas substâncias odoríferas diferentes uma pessoa pode distinguir se

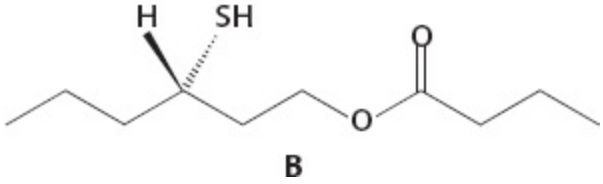
cada substância odorífera se liga a um único tipo de receptor, e cada receptor se liga apenas a uma única substância odorífera? Quantas se cada substância odorífera se liga a dois receptores odoríferos diferentes? A três receptores odoríferos?

9. *Ação da luz*. Descreva o efeito da absorção da sobre o 11-*cis*-retinal ligado à rodopsina.

10. *Espelho, espelho*. Os compostos A e B tipicamente produzem odores diferentes; o composto A é descrito como tendo um odor semelhante a fruta tropical, e o composto B, a cebola.



A



B

Explique como esses dois compostos semelhantes podem ter odores tão diferentes.

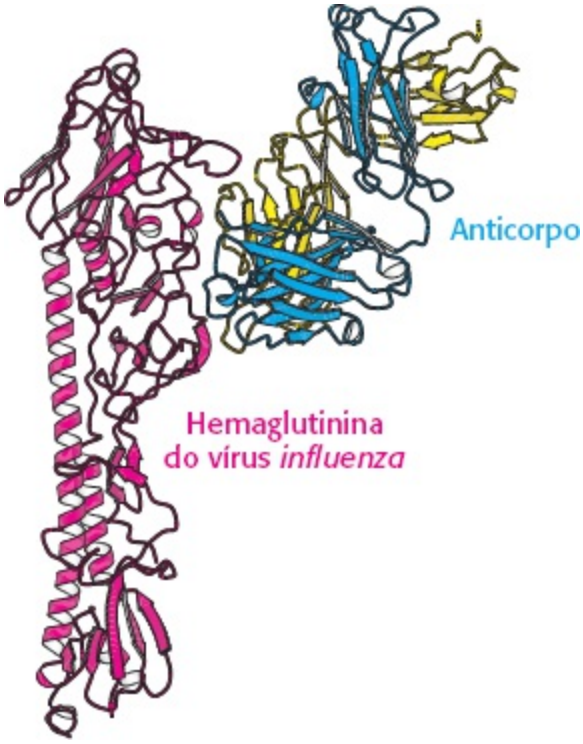
11. *Canalização*. Forneça um exemplo de canal iônico na visão, no paladar e na audição.

Questão | Integração de capítulos

12. *Energia e informação*. A transmissão de informação sensorial requer a entrada de energia livre. Para cada sistema sensorial (olfação, gustação, visão, audição e tato), identifique mecanismos para a entrada de energia livre que possibilite a transmissão de informação sensorial.

Questão sobre mecanismo

13. *Formação de base Schiff*. Proponha um mecanismo para a reação entre a opsina e o 11-*cis*-retinal.



Assim como os soldados medievais usavam suas armas e as paredes do castelo para defender a sua cidade, o sistema imunológico luta constantemente contra invasores estranhos, como vírus, bactérias e parasitos para defender o organismo. As moléculas de anticorpos representam um elemento-chave no arsenal defensivo do sistema imunológico. Por exemplo, anticorpos específicos podem ligar-se a moléculas na superfície dos vírus e impedir que eles infectem as células. Acima, à direita, um anticorpo liga-se a uma subunidade da hemaglutinina na superfície do vírus. [Imagem à esquerda, The Granger Collection.]

SUMÁRIO

34.1 Os anticorpos são constituídos de unidades distintas de ligação de antígeno e efetoras

34.2 Os anticorpos ligam-se a moléculas específicas por meio de alças hipervariáveis

34.3 A diversidade é gerada por rearranjos gênicos

34.4 As proteínas do complexo principal de histocompatibilidade apresentam antígenos peptídicos na superfície celular para reconhecimento pelos receptores de células T

34.5 O sistema imunológico contribui para a prevenção e o desenvolvimento de doenças humanas

Estamos constantemente expostos a uma incrível diversidade de bactérias, vírus e parasitos, muitos dos quais se desenvolveriam em nossas células ou líquidos extracelulares não fosse o nosso sistema imunológico. Como o sistema imunológico nos protege? O corpo humano dispõe de duas linhas de defesa: um *sistema imune inato*, que responde rapidamente a características presentes em muitos patógenos, e um *sistema imune adaptativo*, que responde a características específicas que só estão presentes em determinado patógeno. *Tanto o sistema imune inato quanto o sistema imune adaptativo identificam inicialmente características dos organismos causadores de doença e, em seguida, trabalham para eliminar ou neutralizar esses organismos*. Embora uma descrição pormenorizada do sistema imunológico certamente esteja além do escopo deste livro, o presente capítulo trata de conceitos bioquímicos, como estrutura das proteínas, interações receptor-ligante e transdução de sinais, e mostra como eles são aplicados na identificação de patógenos.

O sistema imunológico precisa enfrentar dois grandes desafios na identificação de patógenos: (1) produzir um sistema de receptores suficientemente diversificados para reconhecer uma ampla variedade de patógenos potenciais e (2) diferenciar os invasores e seus produtos causadores de doença dos próprios produtos do organismo (*i.e.*, reconhecimento do próprio *versus* do não próprio). Para enfrentar esses desafios, o sistema imune inato desenvolveu a capacidade de reconhecer elementos estruturais, como glicolipídios específicos ou formas de ácidos nucleicos, que estão bem conservados nos patógenos, mas que estão ausentes no hospedeiro. Entretanto, o repertório desses elementos é limitado, e alguns patógenos dispõem de estratégias para escapar a essa detecção. O sistema imune adaptativo tem a notável capacidade de produzir mais de 10^8 proteínas distintas, denominadas anticorpos, que podem reconhecer diferentes moléculas estranhas, e mais de 10^{12} receptores nas células imunes, denominados receptores de células T (TCR, do inglês *T-cell receptors*), cada um dos quais apresenta uma superfície diferente com o potencial de ligar-se especificamente a uma estrutura de determinado organismo estranho. Entretanto, ao produzir essa vasta diversidade de moléculas de defesa, o sistema imune adaptativo tem o potencial de criar anticorpos e células T que reconhecem e atacam células ou moléculas normalmente presentes no próprio corpo – uma situação que pode levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes.

Neste capítulo analisaremos esses desafios, concentrando-nos, inicialmente, nas estruturas das proteínas que reconhecem os organismos estranhos e, a seguir, nos mecanismos que nos protegem de um patógeno específico após o seu reconhecimento. Também neste capítulo estudaremos a construção molecular das proteínas do sistema imunológico – identificando módulos estruturais e considerando como uma diversidade espetacular pode surgir de uma construção modular.

A imunidade inata é um sistema de defesa evolutivamente antigo

A imunidade inata é um sistema de defesa evolutivamente antigo, encontrado, pelo menos de algum modo, em todas as plantas e animais multicelulares. O sistema imune inato representa a primeira linha de defesa contra patógenos estranhos e depende da presença de características comuns nos organismos invasores para identificar e eliminar essas ameaças. Os componentes do sistema imune inato incluem o revestimento epitelial que circunda as células do hospedeiro e células especializadas, denominadas *fagócitos*, que têm a capacidade de ingerir e destruir patógenos sem o auxílio do sistema imune adaptativo.

O sistema imune inato também é constituído por uma família de receptores capazes de reconhecer características específicas presentes na maioria dos patógenos, sem contudo responder a materiais normalmente presentes no hospedeiro. Entre esses receptores, os mais bem elucidados são os *receptores semelhantes a Toll* (TLR, *do inglês Toll-like receptors*). A designação "semelhante a Toll" provém de um receptor conhecido como Toll codificado no genoma de *Drosophila*. O Toll foi inicialmente identificado em uma triagem de genes importantes para o desenvolvimento de *Drosophila*; mais tarde, foi constatado que ele desempenha um papel essencial no sistema imune inato em uma fase posterior do desenvolvimento. Os TLR compartilham uma estrutura comum (Figura 34.1). Cada receptor é constituído de um grande domínio extracelular formado principalmente de sequências repetidas de aminoácidos, denominadas repetições ricas em leucina (LRR, *do inglês leucine-rich repeats*). Tipicamente, cada LRR contém 20 a 30 resíduos, incluindo 6 que consistem habitualmente em leucina. Os TLR humanos apresentam 18 a 27 LRR, que são seguidas por uma sequência que forma uma única hélice transmembranar e um domínio de sinalização intracelular. Esse

domínio de sinalização não é uma proteína quinase, porém atua como local de atracagem para outras proteínas. Os TLR são expressos, em sua maioria, na membrana celular para a detecção de patógenos extracelulares, como fungos e bactérias. Outros TLR estão localizados nas membranas de compartimentos internos para a detecção de patógenos intracelulares, como vírus e algumas bactérias.

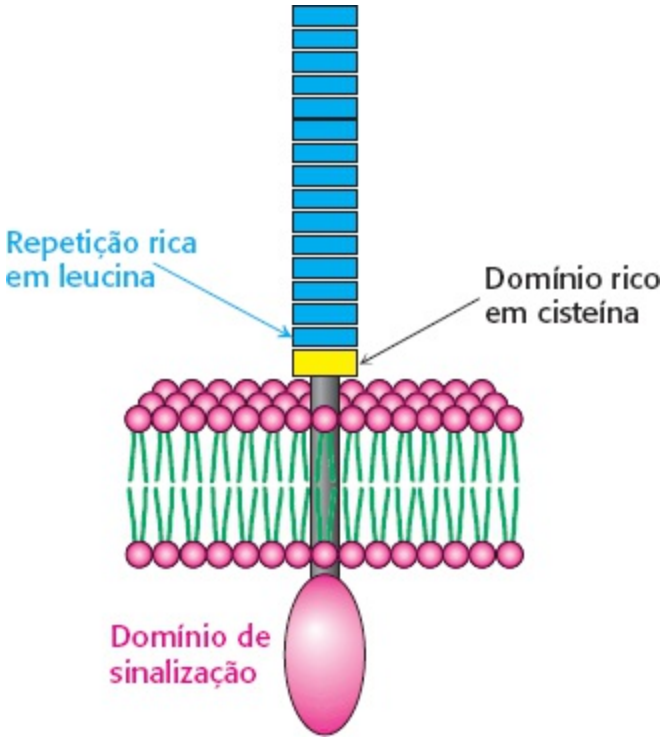


Figura 34.1 Receptor semelhante a Toll. Cada receptor é constituído de um conjunto de 18 ou mais sequências repetidas ricas em leucinas, seguidas de um domínio rico em cisteína, uma única hélice transmembranar e um domínio intracelular que atua na transdução de sinais.

Cada TLR tem como alvo uma característica molecular específica, frequentemente designada como *padrão molecular associado a patógeno* (PAMP, *do inglês pathogen-associated molecular pattern*), encontrado principalmente nos organismos invasores. Tipicamente, o PAMP é um componente crítico da função do patógeno: a ocorrência de mutações nesses alvos não pode facilmente bloquear o reconhecimento pelo TLR sem comprometer a atividade do patógeno. Um PAMP particularmente importante é o lipopolissacarídio (LPS), também chamado de *endotoxina*, uma classe específica de glicolipídios encontrada nas paredes celulares de bactérias gram-negativas, como *E. coli*. O LPS é reconhecido pelo TLR-4. A resposta do sistema imune inato ao LPS pode ser facilmente demonstrada. A injeção de menos de 1 mg de LPS em um ser humano provoca febre e outros sinais de inflamação, mesmo sem a introdução de organismos vivos.

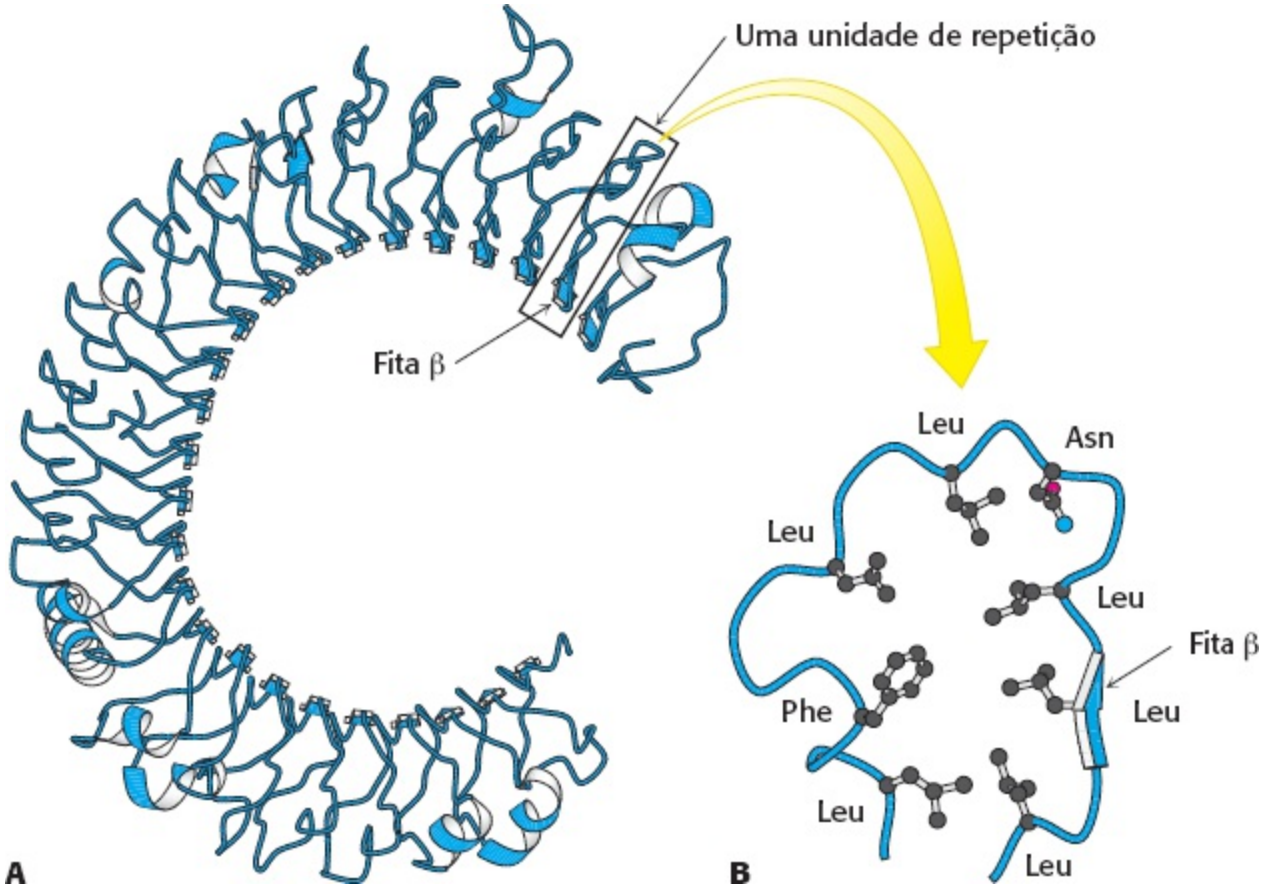


Figura 34.2 Unidade de reconhecimento de PAMP do receptor semelhante a Toll. A. Estrutura do domínio de repetição rica em leucina (LRR) do TLR-3 humano. *Observe* que as unidades de LRR se unem para formar um folheto β paralelo central que se curva para formar uma estrutura côncava. **B**. A estrutura de uma única LRR mostrando as posições dos resíduos que, em geral, são aproximadamente conservados. *Observe* que os resíduos de leucina se unem para formar um cerne hidrofóbico com a única fita β ao longo de um lado. [Desenhada a partir de 1ZIW.pdb.]

Como os TLR reconhecem os PAMP? O domínio de repetição rico em leucina do TLR-3 humano apresenta uma estrutura notável (Figura 34.2). Cada uma de suas unidades LRR contribui com uma única fita β para um grande folheto β paralelo que reveste o interior de uma estrutura côncava. Essa estrutura semelhante a um gancho sugere imediatamente um modelo de como os TLR se ligam aos PAMP – isto é, o PAMP fica no interior do "gancho". Esse modelo tende a ser acurado para alguns TLR. Entretanto, para outros TLR, o sítio de ligação do PAMP parece residir em um lado da estrutura, e a cavidade central é bloqueada por carboidratos do hospedeiro ligados à estrutura.

Independentemente dos detalhes da interação, a ligação do PAMP parece levar à formação de um dímero específico do TLR. O lado citoplasmático desse dímero é um domínio de sinalização que inicia a via de transdução de sinais. Como os TLR e outros componentes do sistema imune são sempre expressos, eles proporcionam ao hospedeiro uma resposta rápida para resistir ao ataque dos patógenos. Entretanto, diversos patógenos também desenvolveram a capacidade de escapar à detecção pelo sistema imune inato. Para se proteger contra esses patógenos, o hospedeiro depende do sistema imune adaptativo, que tem a capacidade de atacar patógenos específicos, inclusive patógenos que nunca encontrou durante a evolução.

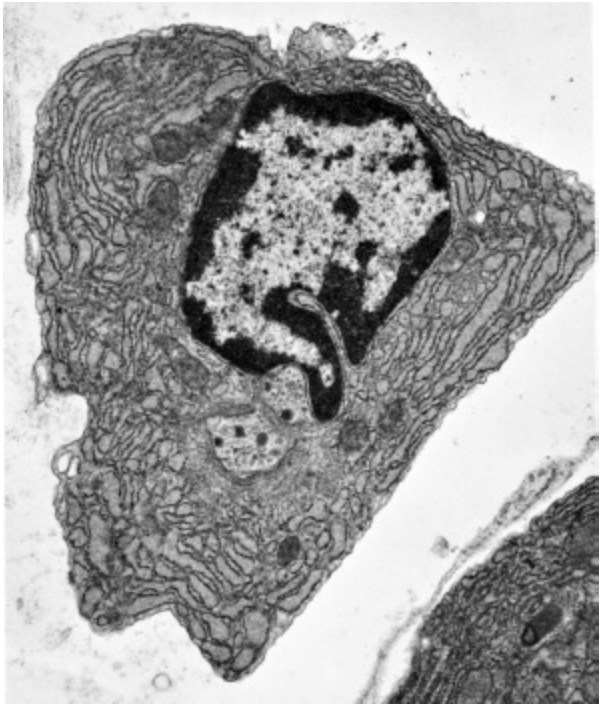


Figura 34.3 Produção de imunoglobulina. Micrografia eletrônica de um plasmócito mostrando o retículo endoplasmático rugoso altamente desenvolvido, necessário para a secreção de anticorpos. [Cortesia de Lynne Mercer.]

O sistema imune adaptativo responde seguindo princípios da evolução

O sistema imune adaptativo compreende dois sistemas paralelos, porém inter-relacionados: as respostas imunes humoral e celular. Na *resposta imune humoral*, proteínas solúveis, denominadas *anticorpos (imunoglobulinas)*, atuam como elementos de reconhecimento, que se ligam a moléculas estranhas e atuam como marcadores, sinalizando a invasão estranha. Os anticorpos são secretados por *plasmócitos*, que são derivados dos *linfócitos B (células B)* (Figura 34.3). O *antígeno* é uma macromolécula estranha, que se liga seletivamente a um anticorpo. Dentro de um contexto fisiológico, se a ligação da molécula estranha estimula uma resposta imune, esta molécula é denominada *imunógeno*. A afinidade específica de um anticorpo não abrange todo o antígeno macromolecular, porém restringe-se a determinado sítio do antígeno, denominado *epítopo* ou *determinante antigênico*. Cada célula B produz apenas um tipo de anticorpo capaz de reconhecer um único epítopo.

Na resposta *imune celular*, células denominadas *linfócitos T citotóxicos* (também comumente denominadas *células T killer*) destroem as células que foram invadidas por um patógeno. Como os patógenos intracelulares não deixam marcas no exterior das células infectadas, os vertebrados desenvolveram um mecanismo para marcar o exterior da célula com uma amostra do conteúdo interno, tanto próprio quanto estranho. Algumas das proteínas internas são degradadas a peptídios, que a seguir são ligados a um complexo de proteínas de membrana integrais, codificadas pelo *complexo principal de histocompatibilidade* (MHC). As células T examinam continuamente os peptídios ligados para identificar e matar células que exibem módulos estranhos em suas superfícies. Outra classe de células T, denominadas *linfócitos T auxiliares (helper T lymphocytes)*, contribui para as respostas imunes tanto humoral quanto celular ao estimular a diferenciação e a proliferação de células B e células T citotóxicas apropriadas. A resposta imune celular é mediada por receptores específicos que são expressos nas superfícies das células T.

A notável capacidade do sistema imunológico de se adaptar a um conjunto essencialmente

ilimitado de patógenos potenciais exige um poderoso sistema para a transformação das células imunes e moléculas presentes em nossos sistemas, em resposta à presença de patógenos. *Esse sistema adaptativo opera pelos princípios da evolução, incluindo reprodução com variação, seguida de seleção dos membros mais bem adaptados de uma população*.

Se o genoma humano contém, de acordo com as últimas estimativas, apenas 25.000 genes, como o sistema imunológico pode produzir mais de 10^8 anticorpos diferentes e 10^{12} receptores de células T? A resposta é encontrada em um novo mecanismo para gerar um conjunto altamente diversificado de genes a partir de um conjunto limitado de unidades estruturais genéticas. A ligação de diferentes conjuntos de regiões de DNA de maneira combinatória produz numerosos genes distintos que codificam proteínas, que não estão presentes no genoma. Em seguida, um processo rigoroso de seleção possibilita apenas a proliferação de células que sintetizam proteínas consideradas úteis na resposta imune. A reprodução subsequente dessas células sem recombinação adicional serve para enriquecer a população de células com membros que expressam tipos particulares de proteínas.

O processo de seleção, que determina que células imunes se reproduzirão, é fundamental para o desenvolvimento da resposta imune. O processo compreende vários estágios. Nos primeiros estágios do desenvolvimento de uma resposta imune, as células que expressam moléculas que se ligam firmemente a moléculas próprias são destruídas ou silenciadas, enquanto as que expressam moléculas que não se ligam fortemente a moléculas próprias e que apresentam o potencial de ligar-se firmemente a moléculas estranhas são preservadas. O aparecimento de um invasor imunogênico mais tarde irá estimular a reprodução das células que expressam anticorpos ou receptores de células T que se ligam especificamente a elementos desse patógeno – em termos evolutivos, ocorre seleção dessas células. Por conseguinte, a resposta imune baseia-se na seleção de células que expressam moléculas especificamente efetivas contra determinado invasor. A resposta evolui a partir de uma população com ampla gama de especificidades para uma coleção mais focalizada de células e moléculas bem adaptadas para defender o hospedeiro quando este se confrontar com determinado desafio.

Os anticorpos e os receptores de células T não apenas resultam da diversidade e recombinação genéticas, mas os anticorpos também exibem estruturas altamente diversas. Os anticorpos necessitam de muitas soluções estruturais diferentes para ligar numerosos antígenos diferentes, cada um deles exibindo uma forma diferente. Em contrapartida, os receptores de células T não são estruturalmente diversificados, visto que eles evoluíram simultaneamente com o MHC. O modo de atracagem de um receptor de células T ao peptídio ligado ao MHC é semelhante para todas as estruturas. Em consequência dessa coevolução, cada receptor de células T apresenta uma reatividade inerente com cada MHC. A evolução conjunta assegura que todos os receptores de células T possam examinar detalhadamente todos os complexos de peptídio-MHC em todos os tecidos. A diversidade genética dos 10^{12} receptores diferentes de células T está concentrada em um conjunto altamente diverso de resíduos no centro do sulco do MHC. Em virtude dessa diversidade localizada, o receptor de células T pode reconhecer os numerosos peptídios exógenos diferentes ligados ao MHC. Os receptores de células T precisam inspecionar muitos complexos MHC-peptídio diferentes com rápida renovação. Por esse motivo, as afinidades de ligação entre os receptores de células T e o MHC são mais fracas do que aquelas entre anticorpo e antígeno.

34.1 Os anticorpos são constituídos de unidades distintas de ligação de antígeno e efetoras

Os anticorpos são os principais atores moleculares na resposta imune. No Capítulo 3, foi discutida a aplicação dos anticorpos como ferramentas para o estudo das proteínas; neste capítulo, consideraremos as estruturas nativas e funções dessas moléculas notáveis. Em 1959, Rodney Porter mostrou que a *imunoglobulina G* (IgG), o principal anticorpo encontrado no soro, pode ser clivada em três fragmentos de 50 kDa pela ação proteolítica limitada da papaína. Dois desses fragmentos ligam-se a antígenos. São denominados F_{ab} (*F*, de *f*ragmento; *ab* de ligação a *a*ntígeno [do inglês, *antigen binding*]). O outro fragmento, denominado F_c pela sua capacidade de rápida cristalização, não se liga a antígenos, porém tem outras atividades biológicas importantes, incluindo a mediação de respostas, denominadas *funções efetoras*. Essas funções incluem a iniciação da *cascata do complemento*, um processo que leva à lise das células-alvo. Embora essas funções efetoras sejam cruciais para o funcionamento do sistema imune, elas não serão discutidas aqui.

Como esses fragmentos se relacionam com a estrutura tridimensional de moléculas integrais de IgG? A imunoglobulina G é constituída de dois tipos de cadeias polipeptídicas, uma *cadeia leve* (L) de 25 kDa e uma *cadeia pesada* (H) de 50 kDa (Figura 34.4). A composição em subunidades é L_2H_2. Cada cadeia L liga-se a uma cadeia H por uma ponte de dissulfeto, e as cadeias H estão ligadas entre si por pelo menos uma ponte de dissulfeto. O exame da sequência de aminoácidos e das estruturas tridimensionais das moléculas de IgG revela que cada cadeia L é constituída de dois domínios homólogos, denominados *domínios de imunoglobulina*, que são descritos de modo detalhado na Seção 34.2. Cada cadeia H tem quatro domínios de imunoglobulina. De modo global, a molécula adota uma conformação que se assemelha à letra Y. A haste da letra Y, que corresponde ao fragmento F_c obtido por clivagem com papaína, é constituída dos dois domínios de imunoglobulina carboxiterminais de cada cadeia H, enquanto os dois braços do Y, que correspondem aos dois fragmentos F_{ab}, são formados pelos dois domínios aminoterminais de cada cadeia H e pelos dois domínios aminoterminais de cada cadeia L. As ligações entre a haste e os dois braços do Y são constituídas por regiões polipeptídicas distendidas dentro das cadeias H e são muito flexíveis.

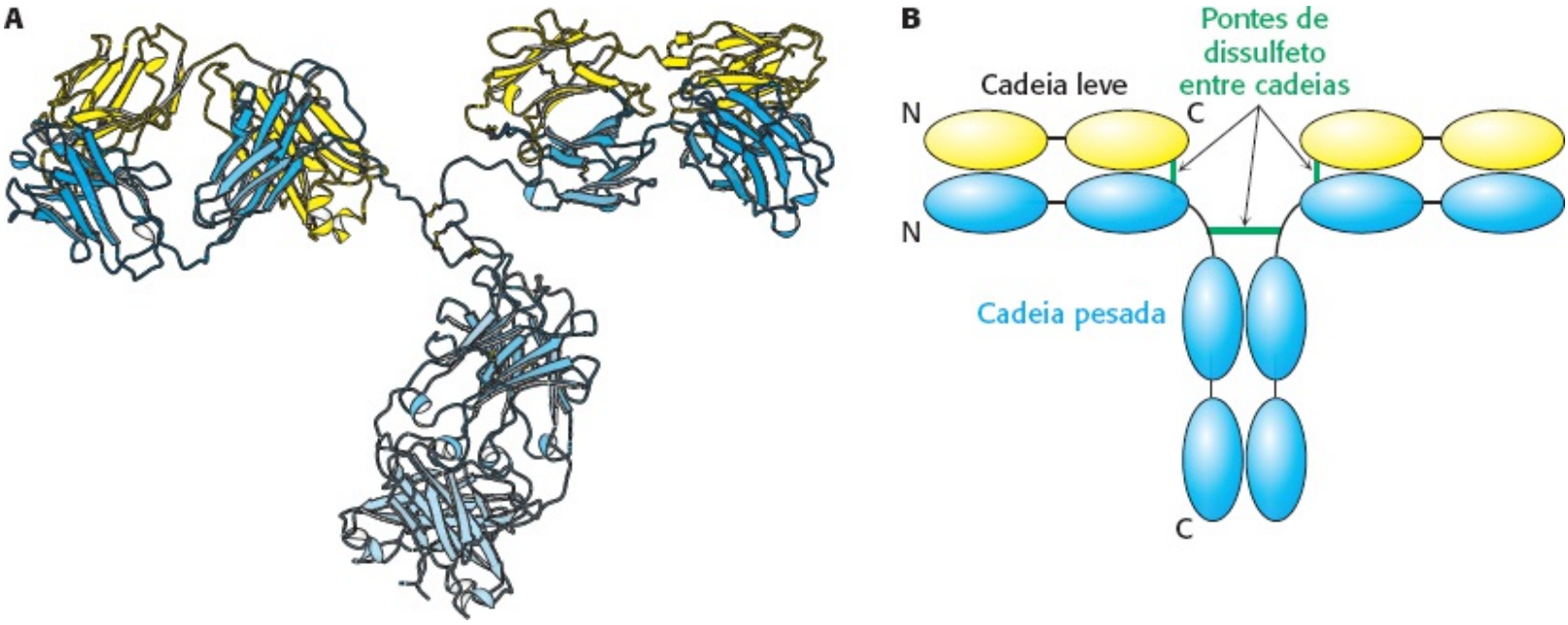


Figura 34.4 Estrutura da imunoglobulina G. A. Estrutura tridimensional de uma molécula de IgG, mostrando as cadeias leves, em amarelo, e as cadeias pesadas, em azul. **B**. Vista esquemática de uma molécula de IgG, indicando as posições das pontes de dissulfeto entre as cadeias. N, aminoterminal; C, carboxiterminal. [Desenhada a partir de 1IGT.pdb.]

Tabela 34.1 Propriedades das classes de imunoglobulinas.

Classe	Concentração sérica (mg m/−1)	Massa (kDa)	Cadeias leves	Cadeias pesadas	Estrutura da cadeia
IgG	12	150	κ ou λ	γ	$\kappa_2\lambda_2$ ou $\lambda_2\gamma_2$
IgA	3	180 a 500	κ ou λ	α	$(\kappa_2\alpha_2)_n$ ou $(\lambda_2\alpha_2)_n$
IgM	1	950	κ ou λ	μ	$(\kappa_2\mu_2)_5$ ou $(\kappa_2\mu_2)_5$
IgD	0,1	175	κ ou λ	δ	$\kappa_2\delta_2$ ou $\lambda_2\delta_2$
IgE	0,001	200	κ ou λ	ε	$\kappa_2\varepsilon_2$ ou $\lambda_2\varepsilon_2$

Nota: n = 1, 2 ou 3. A IgM e oligômeros da IgA também contêm cadeias J que conectam moléculas de imunoglobulina. A IgA em secreções tem um componente adicional.

A papaína cliva as cadeias H no lado carboxiterminal da ponte de dissulfeto que liga cada cadeia L a cada cadeia H (Figura 34.5). Por conseguinte, cada F_{ab} consiste em uma cadeia L inteira e na metade aminoterminal de uma cadeia H, enquanto o F_c é constituído pelas metades carboxiterminais de ambas as cadeias H. Cada F_{ab} contém um único sítio de ligação de antígeno. Como uma molécula de IgG intacta contém dois componentes F_{ab} e, portanto, apresenta dois sítios de ligação, ela pode efetuar a ligação cruzada de múltiplos antígenos (Figura 34.6). Além disso, o F_c e as duas unidades de F_{ab} da IgG intacta são unidos por regiões polipeptídicas flexíveis, que possibilitam uma fácil variação do ângulo entre as unidades F_{ab} através de uma grande amplitude (Figura 34.7). Esse tipo de mobilidade, denominado *flexibilidade segmentar*, pode potencializar a formação do complexo anticorpo-antígeno, possibilitando a ligação de ambos os sítios de combinação de um anticorpo a um antígeno que apresenta múltiplos sítios de ligação, como um revestimento viral, constituído de monômeros idênticos repetidos, ou a superfície de uma bactéria. Os sítios de combinação nas pontas das unidades F_{ab} simplesmente se movem para ajustar a distância entre os determinantes específicos do antígeno.

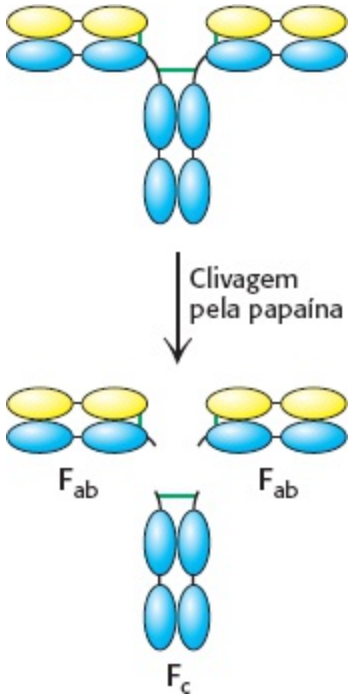


Figura 34.5 Clivagem da imunoglobulina G. O tratamento de moléculas de IgG intactas com a papaína, uma protease, resulta na formação de três grandes fragmentos: dois fragmentos F_{ab} que conservam a capacidade de ligação de antígenos, e um fragmento F_c, que não conserva essa capacidade.

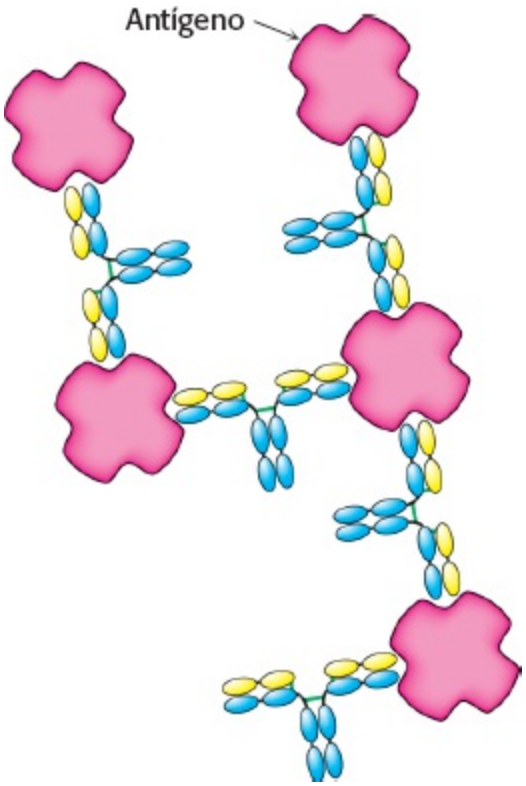


Figura 34.6 Ligação cruzada de antígenos. Como as moléculas de IgG incluem dois sítios de ligação de antígenos, os anticorpos são capazes de efetuar a ligação cruzada de antígenos multivalentes, como as superfícies virais.

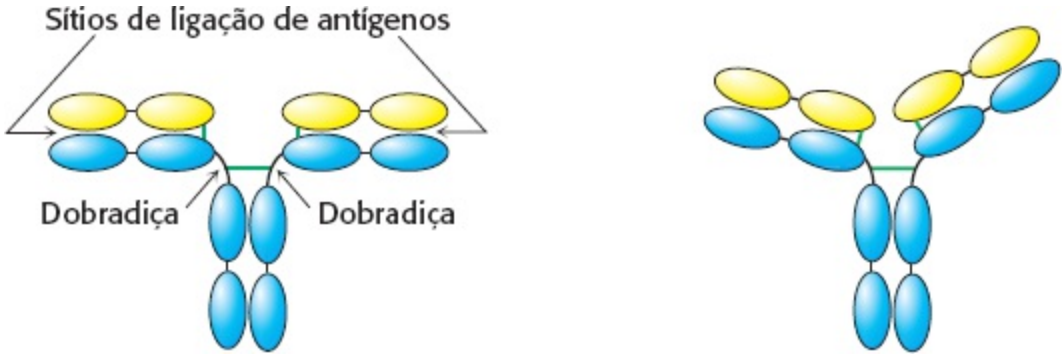


Figura 34.7 Flexibilidade segmentar. As ligações entre as regiões F_{ab} e F_c de uma molécula de IgG são flexíveis, de modo que os dois sítios de ligação de antígenos podem adotar uma gama de orientações um em relação ao outro. Essa flexibilidade possibilita interações efetivas com um antígeno multivalente, sem exigir que os epítopos no alvo estejam a uma distância precisa.

A imunoglobulina G é o anticorpo presente em maior concentração no soro; entretanto, outras classes de imunoglobulinas também são encontradas (Tabela 34.1). Cada classe inclui uma cadeia L (κ e λ) e uma cadeia H distinta (Figura 34.8). As cadeias pesadas na IgG são denominadas cadeias γ, enquanto aquelas das imunoglobulinas A, M, D e E são denominadas, respectivamente, α, μ, δ e ε. A *imunoglobulina M* (IgM) é a primeira classe de anticorpo que aparece no soro após exposição a determinado antígeno. Em virtude da existência de 10 sítios de combinação, a IgM liga-se de modo particularmente firme a antígenos que contêm múltiplos epítopos idênticos. A força de uma interação que compreende múltiplas interações de ligação independentes entre parceiros, é denominada *avidez*, em lugar de afinidade, que denota a força de ligação de um único sítio de combinação.

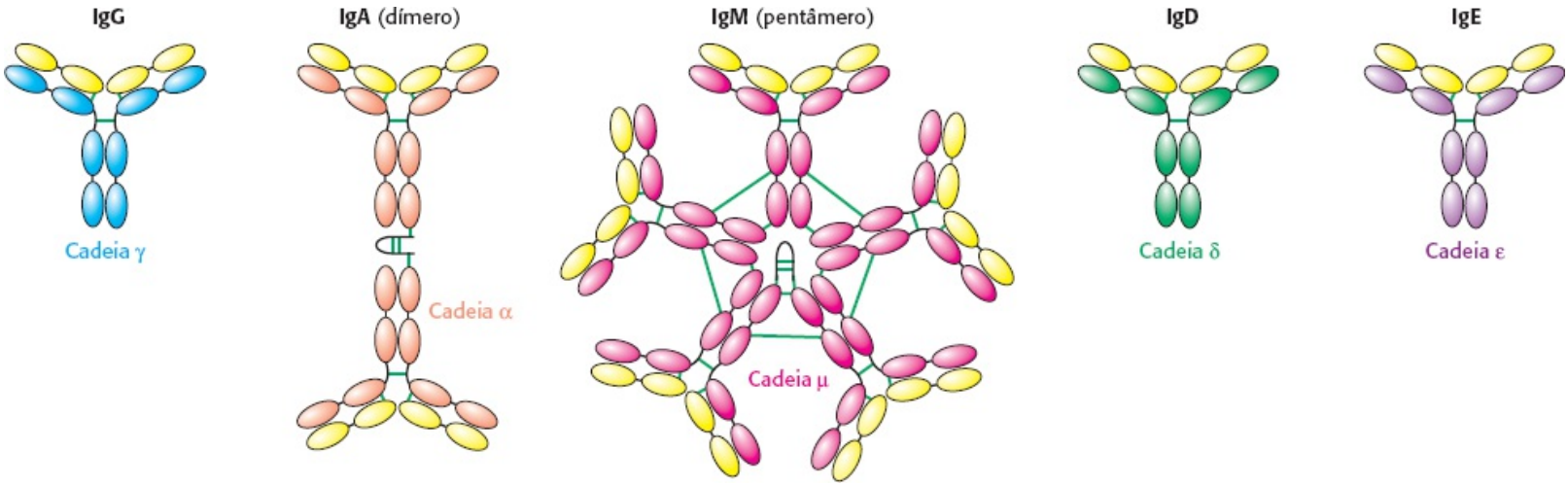


Figura 34.8 Classes de imunoglobulina. Cada uma das cinco classes de imunoglobulina apresenta a mesma cadeia leve (mostrada em amarelo) combinada a uma cadeia pesada diferente (γ, α, μ, δ ou ε). As pontes de dissulfeto estão indicadas por linhas verdes. O dímero IgA e o pentâmero IgM apresentam uma pequena cadeia polipeptídica além das cadeias leves e pesadas.

A *imunoglobulina A* (IgA) é a principal classe de anticorpo nas secreções externas, como a saliva, as lágrimas, o muco brônquico e o muco intestinal. Por conseguinte, a IgA atua como primeira linha de defesa contra antígenos bacterianos e virais. O papel da *imunoglobulina D* (IgD) ainda não é conhecido. A *imunoglobulina E* (IgE) é importante, visto que confere proteção contra parasitos; todavia, ela também participa em reações alérgicas. Os complexos de IgE-antígeno formam ligações cruzadas com receptores de superfície dos mastócitos, desencadeando uma cascata que leva à

liberação de grânulos contendo moléculas farmacologicamente ativas. A histamina, um dos agentes liberados, induz contração da musculatura lisa e estimula a secreção de muco.

34.2 Os anticorpos ligam-se a moléculas específicas por meio de alças hipervariáveis

Uma comparação das sequências de aminoácidos de diferentes anticorpos IgG de seres humanos ou camundongos mostra que a metade carboxiterminal das cadeias L e os três quartos carboxiterminais das cadeias H são muito semelhantes em todos os anticorpos. É importante ressaltar que o domínio aminoterminal de cada cadeia é mais variável, incluindo três segmentos de aproximadamente 7 a 12 aminoácidos dentro de cada cadeia que são hipervariáveis, conforme ilustrado para a cadeia H na Figura 34.9. O domínio de imunoglobulina aminoterminal de cada cadeia é, portanto, designado como *região variável*, enquanto os domínios remanescentes são muito mais semelhantes em todos os anticorpos e são denominados *regiões constantes* (Figura 34.10).

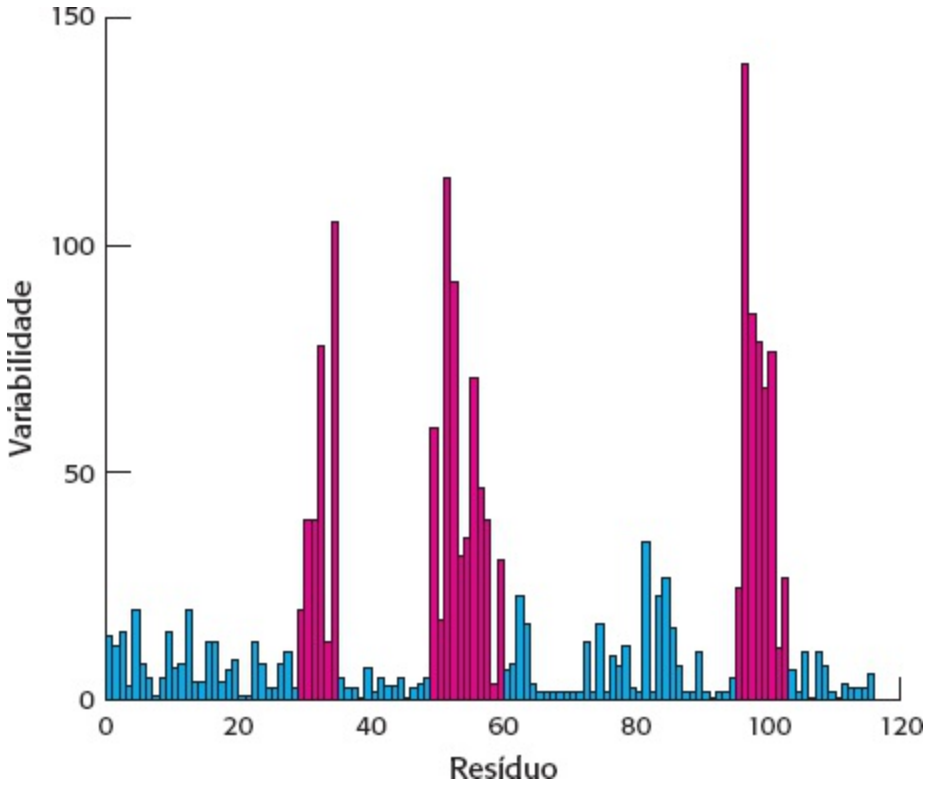


Figura 34.9 Diversidade de sequência das imunoglobulinas. Gráfico da variabilidade de sequência em função da posição ao longo da sequência do domínio aminoterminal de imunoglobulina da cadeia H da IgG humana. Três regiões (em vermelho) exibem níveis notavelmente altos de variabilidade. Essas regiões hipervariáveis correspondem a três alças na estrutura do domínio de imunoglobulina [De R. A. Goldsby, T. J. Kindt, and B. A. Osborne, *Kuby Immunology*, 4th ed. (W. H. Freeman and Company, 2000), p.91.]

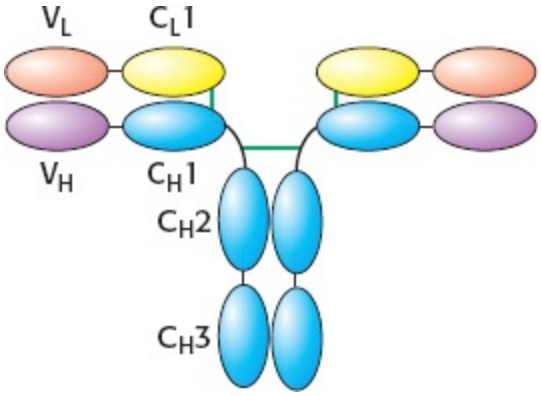


Figura 34.10 Regiões variáveis e constantes. Cada cadeia L e cada cadeia H incluem um domínio de imunoglobulina em sua extremidade aminoterminal, que é muito variável de um anticorpo para outro. Esses domínios são designados como V_L e V_H. Os domínios remanescentes são mais constantes de um anticorpo para outro e são denominados domínios constantes (C_L1, C_H1, C_H2 e C_H3).

O enovelamento de imunoglobulina consiste em uma estrutura em sanduíche beta com alças hipervariáveis

Uma molécula de IgG é constituída de um total de 12 domínios de imunoglobulina. Esses domínios apresentam muitas características de sequência em comum e adotam uma estrutura comum, o *enovelamento de imunoglobulina (domínio de imunoglobulina)* (Figura 34.11). De modo notável, esse mesmo domínio estrutural é encontrado em muitas outras proteínas que desempenham papéis essenciais no sistema imunológico e em funções não imunes.

O enovelamento de imunoglobulina consiste em um par de folhas β, cada uma constituída de fitas β antiparalelas, que circundam um cerne hidrofóbico. Uma única ponte de dissulfeto une os dois folhetos. Dois aspectos dessa estrutura são particularmente importantes para a sua função. Em primeiro lugar, três alças presentes em uma extremidade da estrutura formam uma potencial superfície de ligação. Essas alças contêm as sequências hipervariáveis presentes em anticorpos e nos receptores de células T. A variação nas sequências de aminoácidos dessas alças fornece o principal mecanismo para a geração do conjunto amplamente diverso de anticorpos e receptores de células T expressos pelo sistema imunológico. Essas alças são designadas como *alças hipervariáveis* ou *regiões determinantes de complementaridade* (CDR, *do inglês complementarity-determining region*). Em segundo lugar, a extremidade aminoterminal e a extremidade carboxiterminal encontram-se nas extremidades opostas da estrutura, o que possibilita a união de domínios estruturais, formando cadeias, como nas cadeias L e H dos anticorpos. Essas cadeias são encontradas em várias outras moléculas essenciais do sistema imune.

O enovelamento de imunoglobulina é um dos domínios mais prevalentes codificados pelo genoma humano: mais de 750 genes codificam proteínas com pelo menos um domínio de imunoglobulina reconhecível no nível de sequência dos aminoácidos. Esses domínios também são comuns em outros animais multicelulares, como moscas e nematódeos. Entretanto, somente pela inspeção da sequência de aminoácidos, os domínios de imunoglobulina não parecem estar presentes em leveduras ou plantas, embora esses organismos tenham outros domínios estruturalmente semelhantes, incluindo a plastocianina nas plantas, uma proteína transportadora de elétrons essencial na fotossíntese (Seção 19.3). Por conseguinte, a família de enovelamento de imunoglobulina parece ter tido uma ampla expansão ao longo de ramificações evolutivas que levaram ao surgimento dos

animais – particularmente os vertebrados.

As análises de cristalografia de raios X revelaram como os anticorpos se ligam a antígenos

Para cada classe de anticorpo, os domínios variáveis nas extremidades aminoterminais das cadeias L e H (designados como V_L e V_H) unem-se para formar uma superfície de ligação. As posições das regiões determinantes de complementaridade são notáveis. Essas sequências hipervariáveis, presentes em três alças de cada domínio, juntam-se de modo que todas as seis alças formam uma única superfície na extremidade de cada braço (Figura 34.12). Como praticamente qualquer V_L pode emparelhar-se com qualquer V_H, *um número muito grande de sítios de ligação diferentes pode ser construído por associação combinatória*.

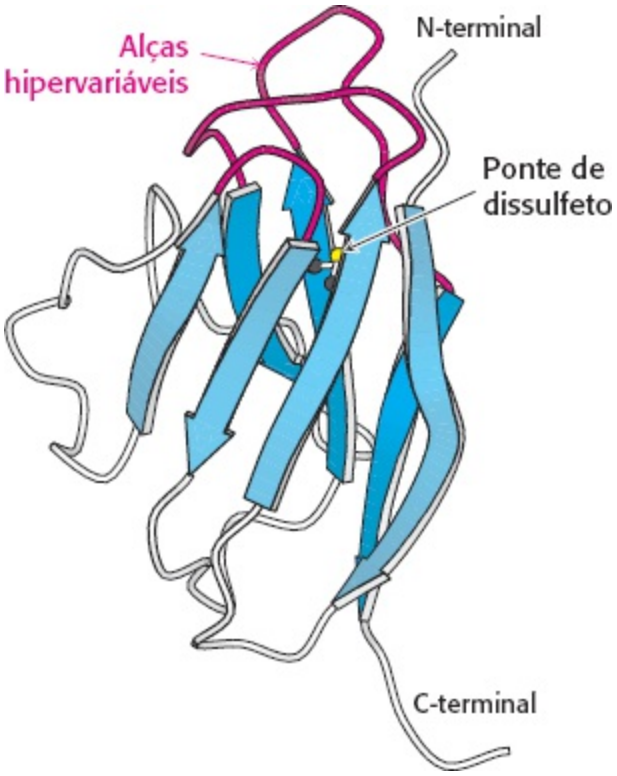


Figura 34.11 Enovelamento de imunoglobulina. Um domínio de imunoglobulina consiste em um par de folhas β ligadas por uma ponte de dissulfeto e interações hidrofóbicas. *Observe* que três alças hipervariáveis encontram-se em uma extremidade da estrutura. [Desenhada a partir de 1DQJ.pbd.]

Os resultados dos estudos cristalográficos de raios X de várias centenas de antígenos grandes e pequenos ligados a moléculas de F_{ab} têm esclarecido muito a base estrutural da especificidade dos anticorpos. A ligação de antígenos a anticorpos é governada pelos mesmos princípios que estabelecem a ligação de substratos às enzimas. A interação entre formas complementares resulta em numerosos contatos entre aminoácidos nas superfícies de ligação de ambas as moléculas. Numerosas pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações de van der Waals, reforçadas por interações hidrofóbicas, combinam-se para proporcionar uma ligação forte e específica.

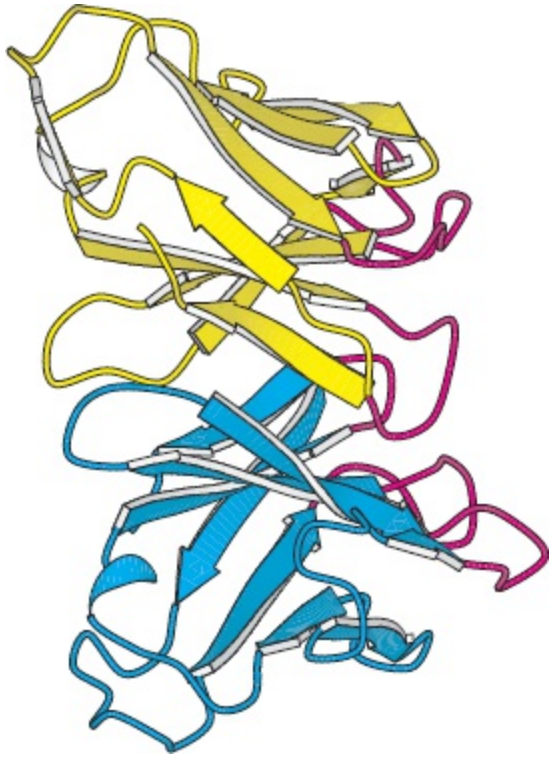


Figura 34.12 Domínios variáveis. Vista lateral dos domínios variáveis da cadeia L (amarelo) e da cadeia H (azul); as regiões determinantes de complementaridade (CDR) são mostradas em vermelho. *Observe* que seis CDR se juntam para formar uma superfície de ligação. A especificidade da superfície é determinada pelas sequências e estruturas das CDR. [Desenhada a partir de 1DQJ.pdb.]

Alguns aspectos da ligação de anticorpos merecem atenção específica, uma vez que se relacionam diretamente com a estrutura das imunoglobulinas. O sítio de ligação no anticorpo incorpora algumas das CDR ou todas elas nos domínios variáveis do anticorpo. As moléculas pequenas tendem a estabelecer contato com uma menor quantidade de CDR, com participação de talvez 15 resíduos do anticorpo na interação de ligação. As macromoléculas frequentemente fazem um contato mais extenso, interagindo, algumas vezes, com todas as seis CDR e 20 ou mais resíduos do anticorpo. Com frequência, as moléculas pequenas ligam-se em uma fenda da região de ligação do antígeno. As macromoléculas, como as proteínas globulares, tendem a interagir com superfícies apostas maiores e bastante planas, exibindo projeções e depressões complementares.

Um bom exemplo de ligação de moléculas pequenas é o caso bem estudado da fosforilcolina ligada ao F_{ab}. A análise cristalográfica demonstrou a ligação da fosforilcolina a uma cavidade revestida por resíduos de cinco CDR – duas da cadeia L e três da cadeia H (Figura 34.13). O grupo trimetilamônio de carga positiva da fosforilcolina está contido dentro da cavidade em forma de cunha, onde interage eletrostaticamente com dois resíduos de carga negativa, um glutamato e um aspartato. O grupo fosforila de carga negativa da fosforilcolina liga-se ao grupo guanidínio de carga positiva de um resíduo de arginina na entrada da fenda e, por uma ponte de hidrogênio, à cadeia lateral de um resíduo de tirosina adjacente. Esse complexo também é estabilizado por numerosas interações de van der Waals, como aquelas estabelecidas por uma cadeia lateral de triptofano.

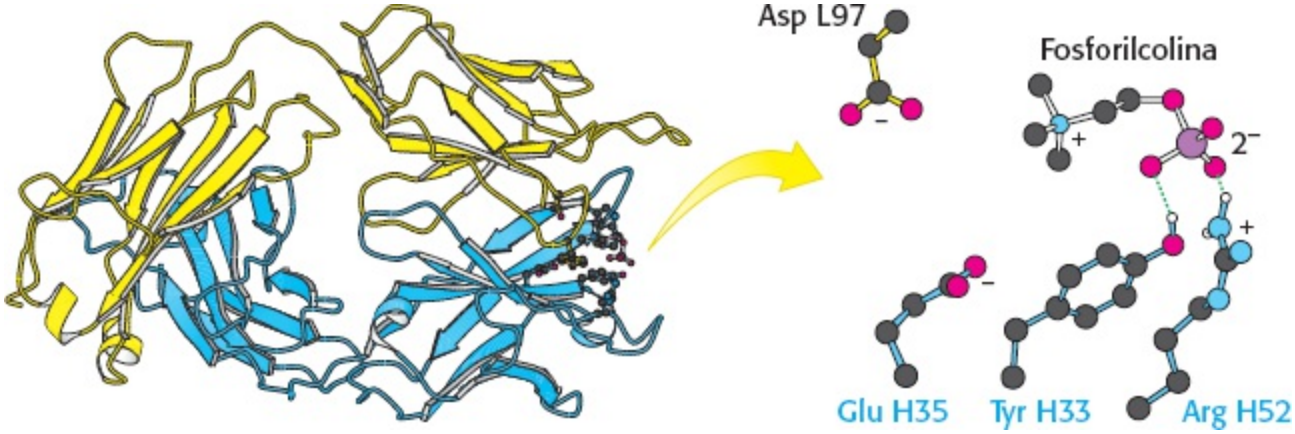


Figura 34.13 Ligação de um antígeno pequeno. Estrutura de um complexo entre um fragmento F_{ab} de um anticorpo e o seu alvo – neste caso, a fosforilcolina. *Observe* que os resíduos do anticorpo interagem com a fosforilcolina por meio de ponte de hidrogênio e interações eletrostáticas. [Desenhada a partir de 2MCP.pdb.]

Os resíduos de cinco CDR participam na ligação da fosforilcolina ao F_{ab} humano. Essa ligação não modifica significativamente a estrutura do anticorpo, porém o ajuste induzido desempenha um papel na formação de muitos complexos antígeno-anticorpo. Um sítio de ligação maleável pode acomodar uma quantidade muito maior de ligantes do que um rígido. Por conseguinte, o ajuste induzido aumenta o repertório de especificidades de anticorpos.

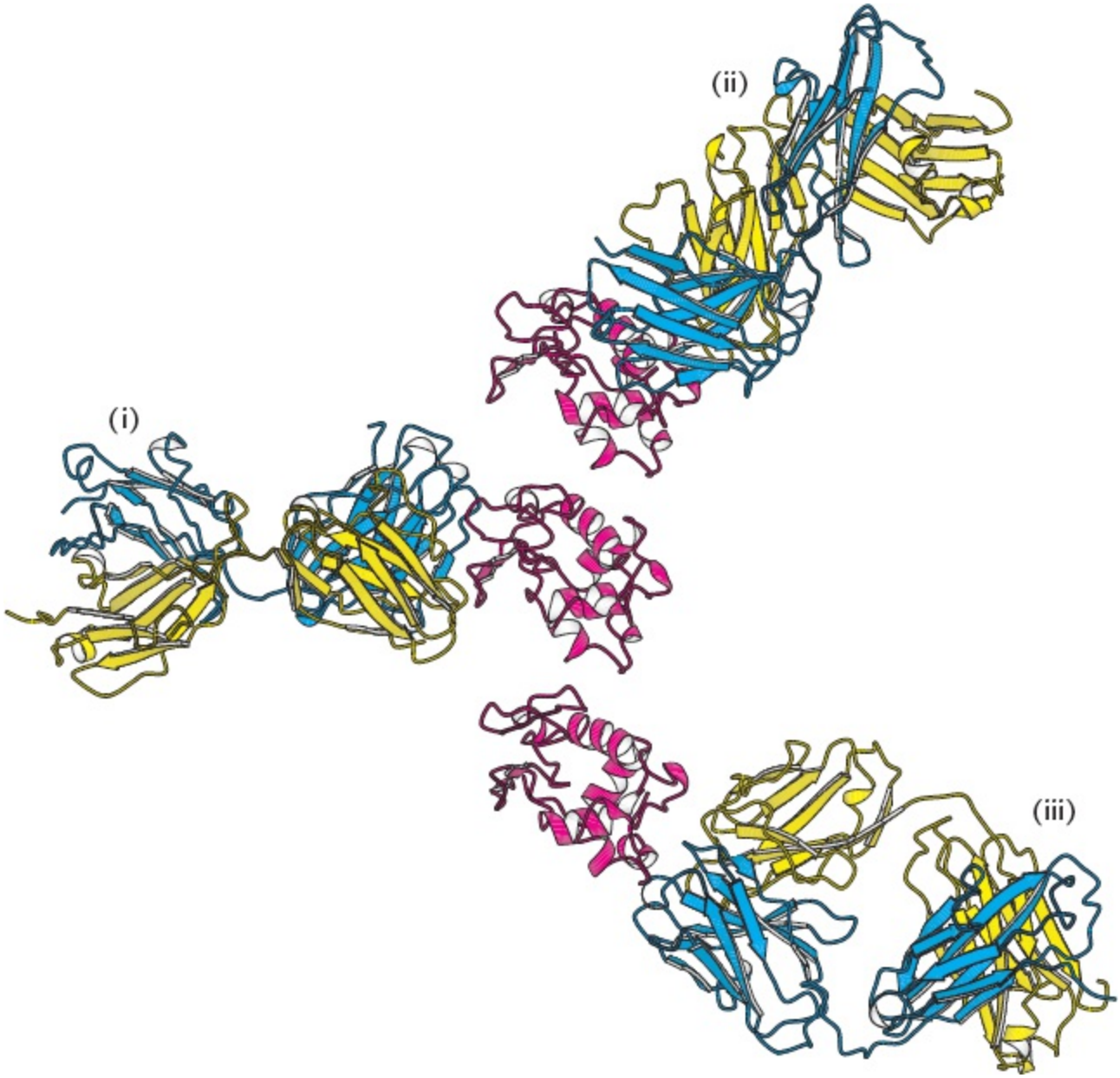


Figura 34.14 Anticorpos contra a lisozima. Estruturas de três complexos (i. ii. iii) entre fragmentos F_{ab} (azul e amarelo) e a lisozima da clara de ovo de galinha (vermelho) mostrados com a lisozima na mesma orientação em cada caso. *Observe* que os três anticorpos reconhecem epítopos totalmente diferentes na molécula de lisozima. [Desenhada a partir de 3HFL, 1DQJ, e 1FDL.pdb.]

Os antígenos grandes ligam-se a anticorpos com numerosas interações

Como os antígenos grandes interagem com anticorpos? Uma grande coleção de anticorpos dirigidos contra a lisozima da clara de ovo de galinha foi caracterizada estruturalmente com grande detalhe (Figura 34.14). Cada anticorpo diferente liga-se a uma superfície distinta da lisozima. Examinaremos com detalhe as interações que ocorrem em um desses complexos (complexo ii na Figura 34.14). Esse anticorpo liga-se a dois segmentos polipeptídicos da lisozima que estão amplamente separados um do outro na estrutura primária (Figura 34.15).

Todas as seis CDR do anticorpo estabelecem contato com esse epítopo. A região de contato é muito extensa (cerca de 30 × 20 Å). As superfícies apostas são bastante planas. A única exceção é a cadeia lateral de glutamina 121 da lisozima, que penetra profundamente no sítio de ligação do anticorpo, onde forma uma ponte de hidrogênio com um átomo de oxigênio da carbonila da cadeia principal e é circundada por três cadeias laterais aromáticas. A formação de 12 pontes de hidrogênio

e de numerosas interações de van der Waals contribui para a alta afinidade (K_d = 20 nM) dessa interação antígeno-anticorpo. O exame da molécula F_{ab} sem proteína ligada revela que as estruturas dos domínios V_L e V_H modificam-se pouco com a ligação, embora se afastem por uma distância de 1 Å para possibilitar um contato mais íntimo com a lisozima.

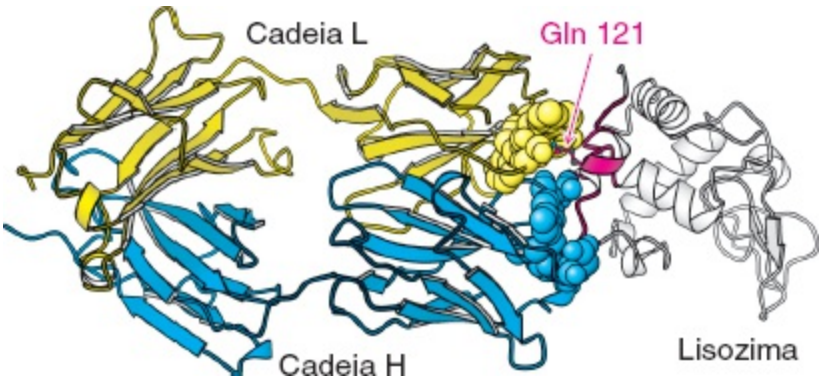


Figura 34.15 Interações proteína-anticorpo. *Observe* que um único resíduo da lisozima, a glutamina 121, penetra mais profundamente no sítio de combinação do anticorpo. [Desenhada a partir de 1FDL.pdb.]

34.3 A diversidade é gerada por rearranjos gênicos

Um mamífero, como um camundongo ou um ser humano, pode sintetizar grandes quantidades de um anticorpo específico contra praticamente qualquer determinante exógeno em questão de poucos dias após a exposição. Vimos que a especificidade dos anticorpos é determinada pelas sequências de aminoácidos das regiões variáveis das cadeias tanto leves quanto pesadas, o que nos remete à questão fundamental: como são produzidas as diferentes sequências das regiões variáveis?

A descoberta de regiões variáveis e constantes distintas nas cadeias L e H levantou a possibilidade de que os genes que codificam imunoglobulinas tenham uma arquitetura incomum, capaz de facilitar a geração de um conjunto diverso de produtos polipeptídicos. Em 1965, William Dreyer e Claude Bennett propuseram que diversos *genes V (variáveis)* estão separados de um único *gene C (constante)* no DNA embrionário (de linhagem germinativa). De acordo com o modelo desses pesquisadores, um desses genes V une-se ao gene C durante o processo de diferenciação da célula produtora de anticorpos. Uma prova decisiva para essa nova hipótese teve que aguardar o isolamento do mRNA puro de imunoglobulina e o desenvolvimento de técnicas para a análise dos genomas de mamíferos. Vinte anos mais tarde, Susumu Tonegawa constatou que os genes V e C estão, de fato, bem distantes no DNA embrionário, enquanto estão estreitamente associados no DNA das células produtoras de anticorpos. Por conseguinte, os genes das imunoglobulinas sofrem rearranjo no processo de diferenciação dos linfócitos.

Os genes J (junção) e os genes D (diversidade) aumentam a diversidade dos anticorpos

Estudos de sequenciamento realizados por Susumu Tonegawa, Philip Leder e Leroy Hood revelaram que os genes V nas células embrionárias não codificam toda a região variável das cadeias L e H. Consideremos, por exemplo, a região que codifica a família de cadeias leves κ. No cromossomo 2 humano, existe uma disposição em série de 40 segmentos, cada um dos quais codifica aproximadamente os primeiros 97 resíduos do domínio variável da cadeia L (Figura 34.16).

Figura 34.16 O *locus* da cadeia leve. Essa parte do cromossomo humano 2 inclui um conjunto de 40 segmentos que codificam a região variável (V) (aproximadamente os resíduos 1 a 97) da cadeia leve, um conjunto de cinco segmentos que codificam a região de junção (J) (resíduos 98 a 110) e uma única região que codifica a região constante (C).

Entretanto, a região variável da cadeia L contém 110 resíduos. Onde está o DNA que codifica os últimos 13 resíduos do domínio variável? Para as cadeias L encontradas em células indiferenciadas, esse segmento de DNA está localizado em uma região inesperada: próximo ao gene C. É denominado *gene J*, visto que *j*unta os segmentos gênicos V e C em uma célula diferenciada. Com efeito, um conjunto em série de cinco segmentos gênicos J está localizado próximo ao gene C nas células embrionárias. Na diferenciação de uma célula produtora de anticorpos, um segmento gênico V é unido a um segmento gênico J (pelo processo de *splicing*) para formar um gene completo para a região variável (Figura 34.17). O *splicing* do RNA produz uma molécula de mRNA para a cadeia L completa ao ligar as regiões codificadoras para a unidade VJ rearranjada àquela da unidade C (Figura 34.18).

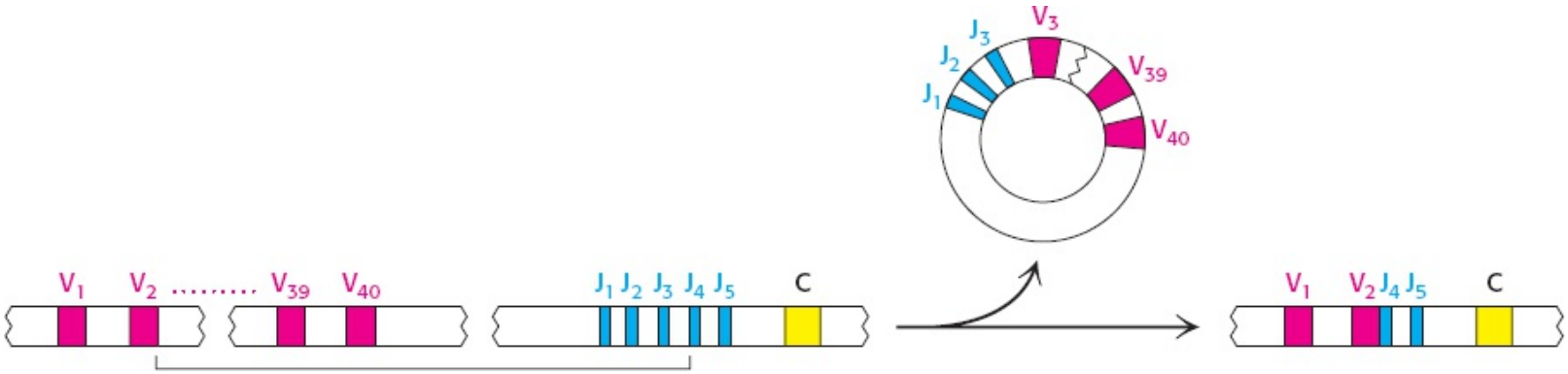


Figura 34.17 Recombinação VJ. Um único gene V (neste caso, V_2) é ligado a um gene J (aqui, J_4) para formar uma região VJ intacta. O DNA intercalar é liberado em uma forma circular. Como as regiões V e J são selecionadas de modo aleatório, e a junção entre elas nem sempre ocorre exatamente no mesmo local, esse processo pode gerar muitas combinações VJ.

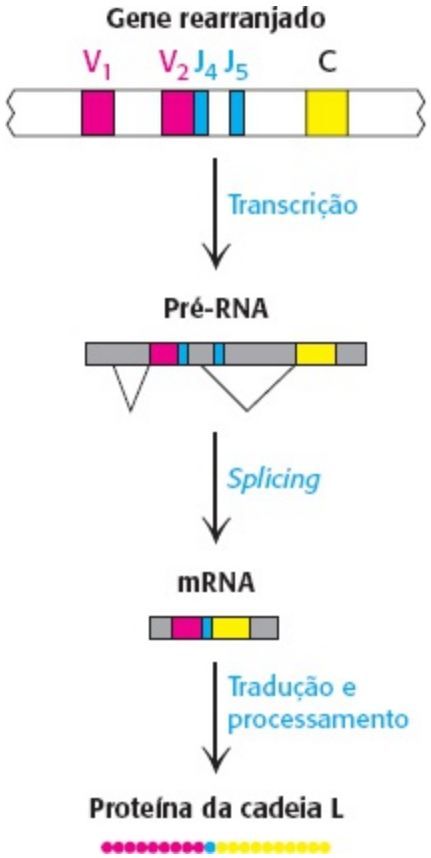


Figura 34.18 Expressão da cadeia leve. A proteína da cadeia leve é expressa pela transcrição do gene rearranjado, produzindo uma molécula de pré-RNA com as regiões VJ e C separadas. O *splicing* do RNA remove as sequências intercalares, produzindo uma molécula de mRNA com as regiões VJ e C ligadas. A tradução do mRNA e o processamento da proteína inicial produzem a cadeia leve.

Os segmentos gênicos J contribuem de modo significativo para a diversidade dos anticorpos, visto que eles codificam parte do último segmento hipervariável (CDR3). Na formação de um gene da região variável contínua, qualquer um dos 40 segmentos gênicos V pode ligar-se a qualquer um dos cinco segmentos gênicos J. Assim, a recombinação somática desses segmentos gênicos amplifica a diversidade já existente na linhagem germinativa. A ligação entre V e J não é controlada de maneira precisa. Pode ocorrer recombinação entre esses genes em uma de várias bases próximas ao códon para o resíduo 95, produzindo mais diversidade. Um conjunto semelhante de segmentos gênicos V e J que codificam a cadeia leve está presente no cromossomo humano 22. Essa região inclui 30 segmentos gênicos V_λ e quatro segmentos gênicos J_λ. Além disso, essa região inclui quatro genes C distintos, em contraste com o único gene C presente no *locus* κ.

Nos seres humanos, os genes que codificam a cadeia pesada encontram-se no cromossomo 14. De modo notável, o domínio variável das cadeias pesadas é montado a partir de *três* segmentos, em vez de dois. Além dos segmentos gênicos V_H que codificam os resíduos 1 a 94 e dos segmentos gênicos J_H que codificam os resíduos 98 a 113, essa região cromossômica inclui um conjunto distinto de segmentos que codificam os resíduos 95 a 97 (Figura 34.19). Esses segmentos gênicos são denominados D (de *d*iversidade). Cerca de 27 segmentos gênicos D situam-se entre 51 segmentos gênicos V_H e 6 segmentos gênicos J_H. O processo de recombinação une inicialmente um segmento gênico D a um segmento gênico J_H; em seguida, um segmento gênico V_H é unido ao DJ_H. Uma maior variedade de segmentos e fendas de ligação de antígeno pode ser formada pela cadeia H, em comparação com a cadeia L, visto que a cadeia H é codificada por três segmentos gênicos, em vez de dois. Além disso, a CDR3 da cadeia H é diversificada pela ação da desoxirribonucleotidil

transferase terminal, uma DNA polimerase especial que não necessita de molde. Essa enzima insere nucleotídios adicionais entre V_H e D. A *recombinação V(D)J* das cadeias L e das cadeias H é efetuada por enzimas específicas presentes nas células imunes. Essas proteínas, denominadas *RAG-1* e *RAG-2*, reconhecem sequências de DNA específicas, denominadas *sequências de sinal de recombinação* (RSS, *do inglês recombination signal sequences*) adjacentes aos segmentos gênicos V, D e J e facilitam a clivagem e a religação dos segmentos de DNA.

Mais de 10^8 anticorpos podem ser formados por associação combinatória e mutação somática

Recapitulemos as fontes de diversidade dos anticorpos. A linhagem germinativa contém um repertório bastante grande de genes da região variável. Para as cadeias leves κ, existem cerca de 40 genes de segmento V e 5 genes de segmento J. Por conseguinte, as combinações de V e J podem formar um total de 40 × 5 = 200 tipos de genes V_κ completos. Uma análise semelhante sugere que pelo menos 120 cadeias leves diferentes podem ser produzidas. Um número maior de genes de cadeia pesada pode ser formado, devido ao papel dos segmentos D. Para 51 segmentos gênicos V, 27 D e 6 J, o número de genes V_H completos que pode ser formado é de 8.262. A associação de 320 tipos de cadeias L com 8.262 tipos de cadeias H produziria 2,6 × 10^6 anticorpos diferentes. A variabilidade nos pontos exatos de junção dos segmentos e outros mecanismos aumenta esse valor em pelo menos duas ordens de magnitude.

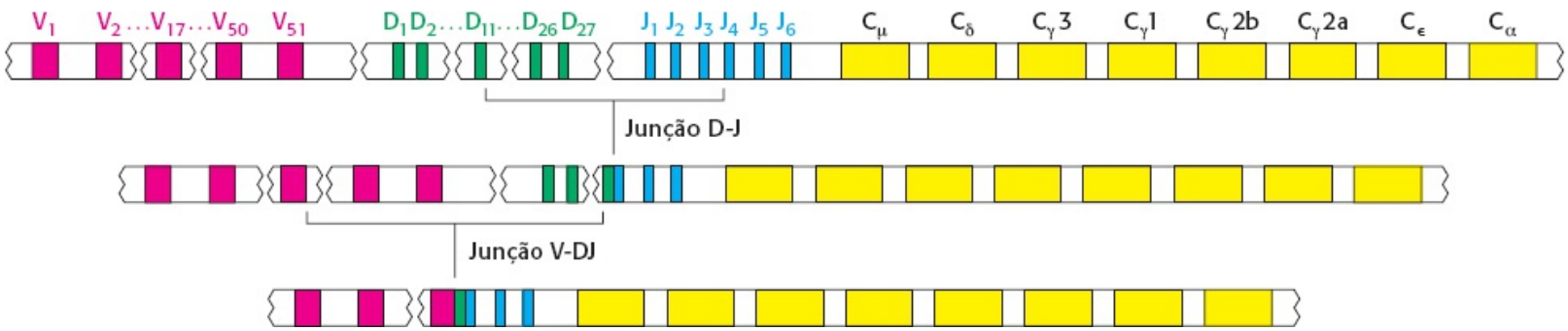


Figura 34.19 Recombinação V(D)J. O *locus* da cadeia pesada inclui um conjunto de 51 segmentos V, 27 segmentos D e 6 segmentos J. O rearranjo gênico começa com a junção D-J, seguida de rearranjo subsequente para ligar o segmento V ao segmento DJ.

A *mutação somática* – isto é, a ocorrência de mutações nos genes recombinados – introduz ainda mais diversidade nas cadeias de anticorpos. De fato, observa-se um aumento de 1.000 vezes na afinidade de ligação durante uma resposta imune humoral típica, em decorrência de mutação somática – um processo denominado *maturação por afinidade*. A produção de um repertório ampliado leva à seleção de anticorpos que se ajusta com mais precisão ao antígeno. Assim, a natureza recorre a cada uma das três fontes de diversidade – um repertório de linhagem germinativa, a recombinação somática e a mutação somática – para produzir a rica variedade de anticorpos que protegem um organismo de incursões estranhas.

A oligomerização de anticorpos expressos na superfície das células B imaturas desencadeia a secreção de anticorpos

Os processos descritos até aqui são responsáveis pela produção de um conjunto altamente

diversificado de moléculas de anticorpo – uma primeira etapa essencial na geração de uma resposta imunológica. O estágio seguinte consiste na seleção de determinado conjunto de anticorpos dirigidos contra um invasor específico. Como essa seleção ocorre? Cada célula B imatura, produzida na medula óssea, expressa uma forma monomérica específica de IgM ligada à sua superfície (Figura 34.20). Cada célula expressa aproximadamente 10^5 moléculas de IgM, porém *todas essas moléculas são idênticas na sua sequência de aminoácidos e, portanto, na sua especificidade de ligação a antígenos*. Por conseguinte, a seleção de determinada célula B imatura para crescimento levará à amplificação de um anticorpo com especificidade exclusiva. O processo de seleção começa com a ligação de um antígeno ao anticorpo ligado à membrana.

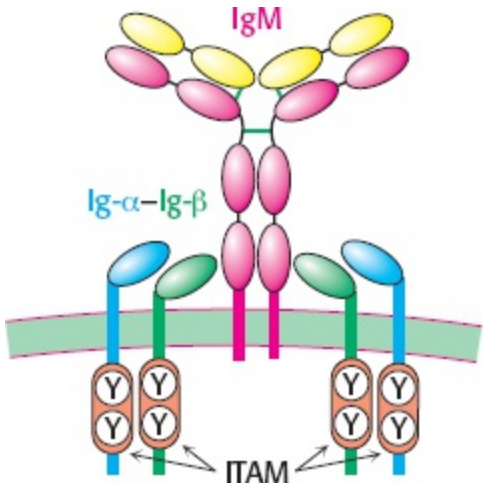


Figura 34.20 Receptor de célula B. Esse complexo consiste em uma molécula de IgM ligada à membrana, ligada de modo não covalente a dois heterodímeros Ig-α–Ig-β. Os domínios intracelulares de cada uma das cadeias Ig-α e Ig-β incluem um motivo de ativação de imunorreceptor com base em tirosina (ITAM).

Cada molécula de IgM ligada à membrana está associada a duas moléculas de uma proteína de membrana heterodimérica, denominada Ig-α–Ig-β (Figura 34.20). O exame das sequências de aminoácidos da Ig-α e Ig-β é extremamente instrutivo. A extremidade aminoterminal de cada proteína situa-se fora da célula e corresponde a um único domínio de imunoglobulina, enquanto a extremidade carboxiterminal, que está localizada dentro da célula, inclui uma sequência de 18 aminoácidos, denominada *motivo de ativação de imunorreceptor com base em tirosina* (ITAM, *do inglês immunoreceptor tyrosine-based activation motif*; Figura 34.20). Como o próprio nome sugere, cada ITAM inclui resíduos de tirosina essenciais, que estão sujeitos à fosforilação por determinadas proteínas quinases presentes em células do sistema imune.

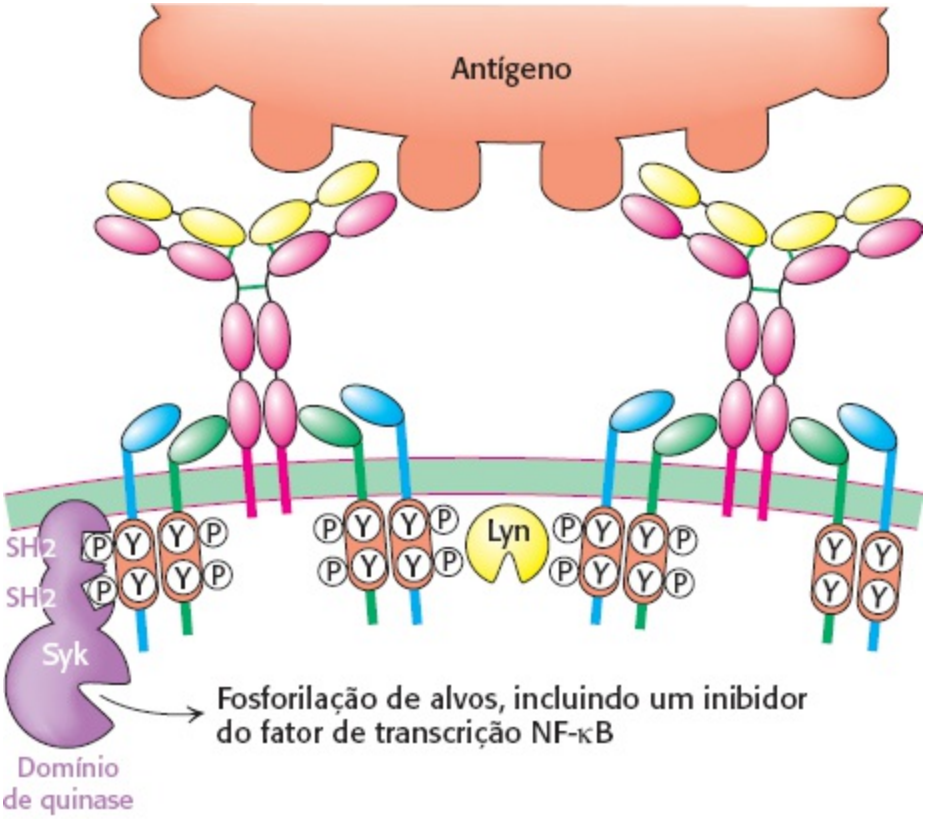
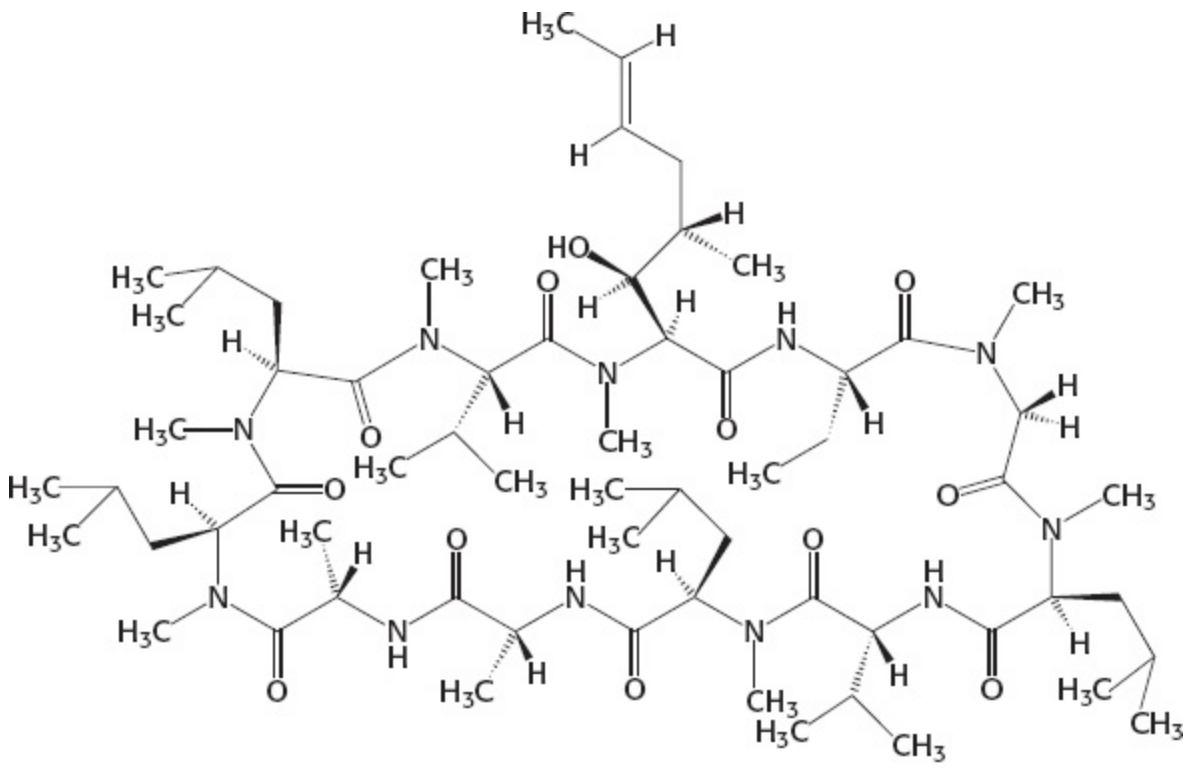


Figura 34.21 Ativação da célula B. A ligação de um antígeno multivalente, como uma superfície bacteriana ou viral, estabelece uma ligação entre moléculas de IgM ligadas à membrana. Essa oligomerização desencadeia a fosforilação de resíduos de tirosina nas sequências do ITAM por tirosino quinases, como a Lyn. Após a fosforilação, os ITAM atuam como locais de atracagem para a Syk, uma proteína quinase que fosforila diversos alvos, incluindo fatores de transcrição.

Uma observação fundamental no que concerne ao mecanismo pelo qual a ligação de um antígeno ao anticorpo ligado à membrana desencadeia as etapas subsequentes da resposta imune consiste na *necessidade de oligomerização ou agrupamento das moléculas de anticorpos* (Figura 34.21). A necessidade de oligomerização lembra a dimerização dos receptores ativados pelo fator de crescimento da epiderme e pela insulina, na Seção 14.3; com efeito, os mecanismos de sinalização associados parecem ser muito semelhantes. A oligomerização dos anticorpos ligados à membrana resulta na fosforilação dos resíduos de tirosina nos ITAM por tirosina quinases, incluindo Lyn, uma quinase homóloga à Src (Seção 14.5). Os ITAM fosforilados atuam como locais de atracagem para uma proteína quinase denominada tirosina quinase do baço (Syk, de ***s**pleen **ty**rosine **k**inase*), que tem dois domínios SH2 que interagem com o par de resíduos de tirosina fosforilados em cada ITAM. A Syk, quando ativada por fosforilação, passa a fosforilar outras proteínas de transdução de sinais, incluindo uma subunidade inibitória de um fator de transcrição, denominado NF-κB, e uma isoforma da fosfolipase C. Os processos de sinalização prosseguem distalmente para ativar a expressão gênica, levando à estimulação do crescimento celular e iniciação de maior diferenciação das células B.

Os fármacos que modulam o sistema imunológico serviram como fontes para a elucidação de vias de sinalização desse sistema. Por exemplo, a *ciclosporina*, um poderoso supressor do sistema imune, atua bloqueando uma fosfatase, denominada *calcineurina*, que normalmente ativa um fator de transcrição, denominado NF-AT, pela sua desfosforilação.



Ciclosporina A

A inibição potente do sistema imune ou *imunossupressão* induzida pela ciclosporina revela o quanto a atividade do NF-AT é crucial para o desenvolvimento de uma resposta imune. Sem esses fármacos, o transplante de órgãos seria extremamente difícil, visto que o tecido transplantado expressa uma ampla gama de antígenos estranhos, causando a rejeição do novo tecido pelo sistema imune do hospedeiro.

O papel da oligomerização na via de sinalização das células B fica esclarecido quando consideramos a natureza de muitos antígenos apresentados por patógenos. As superfícies de numerosos vírus, bactérias e parasitos caracterizam-se por uma variedade de proteínas de membrana ou de carboidratos ligados à membrana idênticas. Por conseguinte, a maioria dos patógenos apresenta múltiplas superfícies de ligação, que naturalmente induzem a oligomerização dos anticorpos associados à membrana à medida que se ligam a epítopos adjacentes. Além disso, o mecanismo é responsável pela observação de que a maioria das moléculas pequenas não induz uma resposta imune. Entretanto, o acoplamento de muitas cópias de uma molécula pequena a uma grande proteína oligomérica, como a hemocianina da lapa (*Megathura crenulata*) (KLH, *do inglês keyhole limpet hemocyanin*), que tem massa molecular de quase 1 milhão de dáltons, ou mais, promove a oligomerização dos anticorpos e, portanto, a produção de anticorpos contra o epítopo representado pela molécula pequena. A proteína grande é denominada *carreador* do grupo químico ligado, o qual é designado como *determinante haptênico*. A pequena molécula estranha é, em si, denominada *hapteno*. Os anticorpos cuja produção é induzida por haptenos ligados também irão se ligar a haptenos não ligados.

Diferentes classes de anticorpos são formadas pela translocação de genes V_H

O desenvolvimento de uma resposta imune humoral efetiva depende da secreção, no sangue, de anticorpos que tenham funções efetoras apropriadas. No início dessa resposta, uma via alternativa de *splicing* de mRNA é ativada, de modo que a produção de IgM ligada à membrana é suplantada pela síntese de IgM secretada. Conforme assinalado na Seção 33.1, a IgM secretada é pentamérica e exibe

alta avidez por antígenos que contêm múltiplos epítopos idênticos. Posteriormente, a célula produtora de anticorpos sintetiza IgG, IgA, IgD ou IgE da mesma especificidade que a IgM inicialmente secretada. Nessa mudança, a cadeia leve e a região variável da cadeia pesada permanecem inalteradas. Apenas a região constante da cadeia pesada é modificada. Essa etapa na diferenciação de uma célula produtora de anticorpos é denominada *mudança de classe* (Figura 34.22). Nas células indiferenciadas, os genes para a região constante de cada classe de cadeia pesada, denominados C_μ, C_δ, C_γ, C_ε e C_α, estão próximos uns dos outros. São em número de oito no total, incluindo quatro genes para as regiões constantes das cadeias γ. Um gene completo para as cadeias pesadas de anticorpo IgM é formado pela translocação de um gene V_H para um segmento gênico DJ_H.

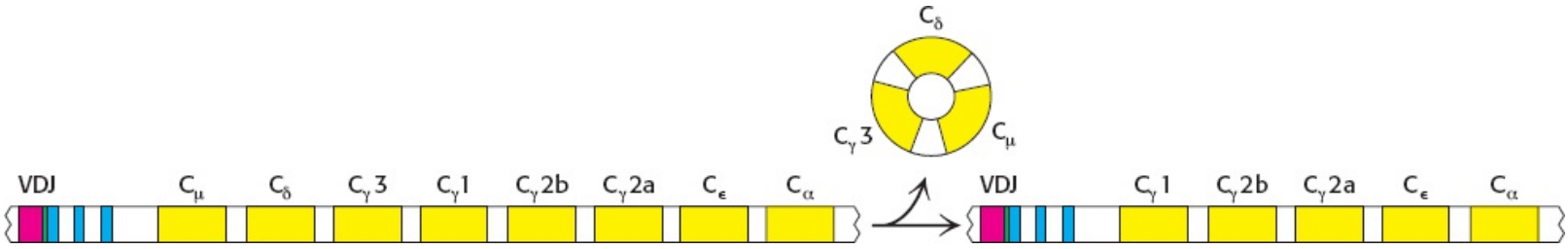


Figura 34.22 Mudança de classe. O rearranjo adicional do *locus* da cadeia pesada resulta na geração de genes para classes de anticorpos diferentes da IgM. No caso ilustrado, o rearranjo coloca a região VDJ próximo à região Cγ1, resultando na produção de IgG1. Observe que não ocorre mais rearranjo da região VDJ, de modo que a especificidade do anticorpo não é afetada.

Como são formadas as outras cadeias pesadas? A mudança de classe é mediada por um processo de rearranjo gênico que desloca um gene VDJ de um local próximo a um gene C para outro local próximo a outro gene C. É importante ressaltar que *a especificidade de ligação de antígenos é conservada na mudança de classe, visto que todo o gene V_HDJ_H é translocado em uma forma intacta*. Por exemplo, a especificidade de combinação de antígenos da IgA produzida por determinada célula é a mesma que a da IgM sintetizada em um estágio mais inicial de seu desenvolvimento. A importância biológica da mudança de C_H é que todo o domínio de reconhecimento (o domínio variável) é deslocado da região constante inicial (C_μ) para uma de várias outras regiões constantes que medeiam diferentes funções efetoras.

34.4 As proteínas do complexo principal de histocompatibilidade apresentam antígenos peptídicos na superfície celular para reconhecimento pelos receptores de células T

Os anticorpos solúveis são altamente efetivos contra patógenos extracelulares; todavia, conferem pouca proteção contra os microrganismos que são predominantemente intracelulares, como alguns vírus e micobactérias (que causam tuberculose e hanseníase). Esses patógenos são protegidos dos anticorpos pela membrana celular do hospedeiro (Figura 34.23). Uma estratégia diferente e mais sutil, a *imunidade mediada por células*, evoluiu para enfrentar os patógenos virais intracelulares. As *células T* examinam continuamente as superfícies de todas as células e matam as que exibem marcadores exógenos. A tarefa não é simples; os microrganismos intracelulares não são tão prestativos a ponto de deixar intencionalmente sinais denunciadores na superfície de seus

hospedeiros. Muito ao contrário, os patógenos bem-sucedidos são mestres na arte da camuflagem. Os vertebrados desenvolveram um mecanismo engenhoso – corte e exibição – para revelar a presença de intrusos escondidos. Quase todas as células de vertebrados exibem, em sua superfície, uma amostra de peptídios derivados da digestão de proteínas em seu citoplasma. Esses peptídios são apresentados por proteínas integrais de membrana, que são codificadas pelo *complexo principal de histocompatibilidade* (MHC, *do inglês major histocompatibility complex*). Especificamente, os peptídios derivados de proteínas citoplasmáticas ligam-se a *proteínas do MHC da classe I*, que as exibem. As células dendríticas do sistema imune inato que fagocitam patógenos migram para o tecido linfático, onde utilizam um mecanismo semelhante ao MHC para apresentar peptídios ou componentes lipídicos exógenos às células T – ligando, assim, as respostas imunes inata e adaptativa a patógenos.

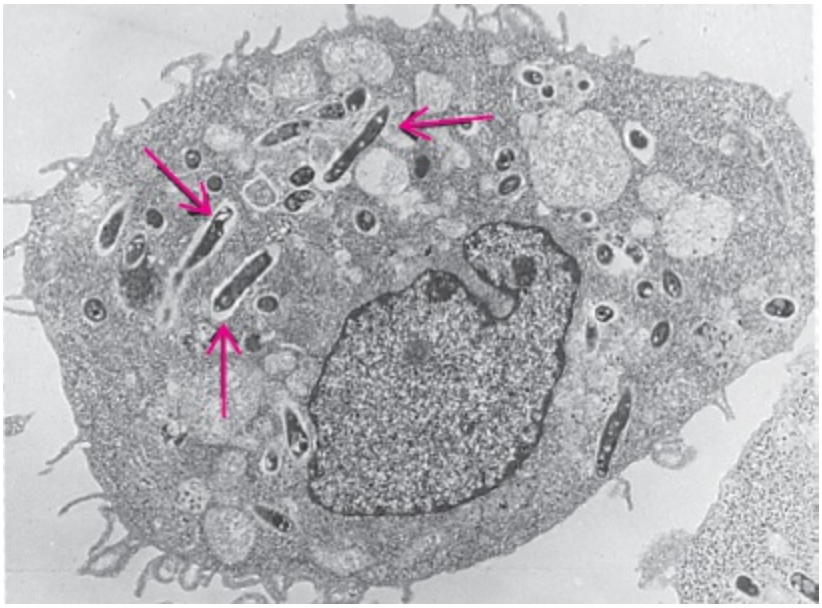


Figura 34.23 Patógeno intracelular. Micrografia eletrônica mostrando micobactérias (setas) no interior de um macrófago infectado. [Cortesia do Dr. Stanley Falkow.]

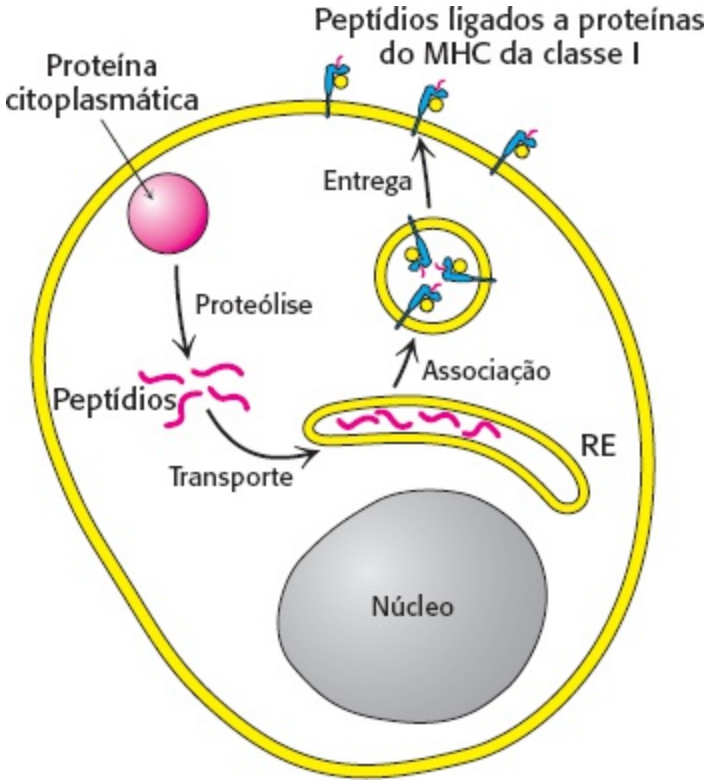


Figura 34.24 Apresentação de peptídios de proteínas citoplasmáticas. As proteínas do MHC da classe I na superfície da maioria das células exibem peptídios que são derivados de proteínas citoplasmáticas por proteólise.

Como esses peptídios são produzidos e transportados até a membrana plasmática? O processo começa no citoplasma com a degradação de proteínas; próprias, bem como de patógenos (Figura 34.24). A digestão é efetuada pelo proteassoma (Seção 23.2). Os fragmentos peptídicos resultantes são transportados do citoplasma para o lúmen do retículo endoplasmático pela *proteína TAP* (*t*ransportador associado a *p*rocessamento de *a*ntígeno), um membro da família de transportadores ABC de bombas impulsionadas por ATP (Seção 13.2). No RE, os peptídios combinam-se com proteínas nascentes do MHC da classe I; em seguida, esses complexos são endereçados para a membrana plasmática.

As proteínas do MHC mergulhadas na membrana plasmática prendem-se firmemente aos peptídios ligados, de modo que possam ser tocadas e examinadas por receptores de células T na superfície de uma célula *killer*. Os peptídios exógenos ligados a proteínas do MHC da classe I sinalizam que a célula está infectada, marcando-a para destruição pelas células T citotóxicas. Uma montagem constituída do complexo peptídio exógeno – MHC, receptor de células T e numerosas proteínas acessórias desencadeia uma cascata que induz a apoptose da célula infectada. Estritamente falando, as células infectadas não são destruídas, e sim induzidas a cometer suicídio para ajudar o organismo.

Os peptídios apresentados pelas proteínas do MHC ocupam um sulco profundo flanqueado por α-hélices

A estrutura tridimensional de um grande fragmento extracelular de uma proteína do MHC humano da classe I, o *antígeno leucocitário humano A2* (HLA-A2), foi esclarecida por Don Wiley e Pamela Bjorkman, em 1987. As proteínas do MHC da classe I consistem em uma cadeia α de 44 kDa ligada de modo não covalente a um polipeptídio de 12 kDa, denominado β_2-*microglobulina*. A cadeia α apresenta três domínios extracelulares (α_1, α_2 e α_3), um segmento transmembranar e uma cauda que se estende no citoplasma (Figura 34.25). A β_2-microglobulina e os domínios α_3 apresentam domínios de

imunoglobulina, embora o pareamento dos dois domínios seja diferente daquele que ocorre nos anticorpos. Os domínios α_1 e α_2 exibem uma nova arquitetura notável. Eles se associam intimamente para formar um sulco profundo, que serve como sítio de ligação de peptídio (Figura 34.26). O assoalho do sulco, que tem cerca de 25 Å de comprimento e 10 Å de largura, é constituído por oito fitas β, quatro de cada domínio. Uma longa hélice proveniente do domínio α_1 forma um dos lados, enquanto uma α-hélice proveniente do domínio α_2 forma o outro lado. *Esse sulco constitui o sítio de ligação para a apresentação de peptídios*.

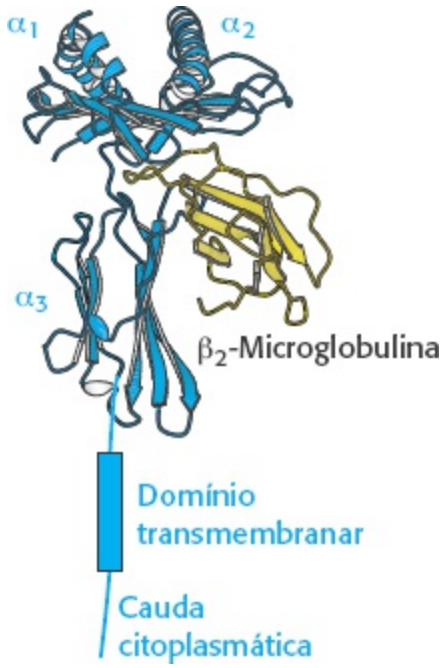


Figura 34.25 Proteína do MHC de classe I. Uma proteína dessa classe contém duas cadeias. *Observe* que a cadeia α começa com dois domínios (α_1, α_2) que incluem α-hélices e que continuam com um domínio de imunoglobulina (α_3), um domínio transmembranar e uma cauda citoplasmática. A segunda cadeia, a β_2-microglobulina, adota um enovelamento de domínio de imunoglobulina. [Desenhada a partir de 1HHK.pdb.]

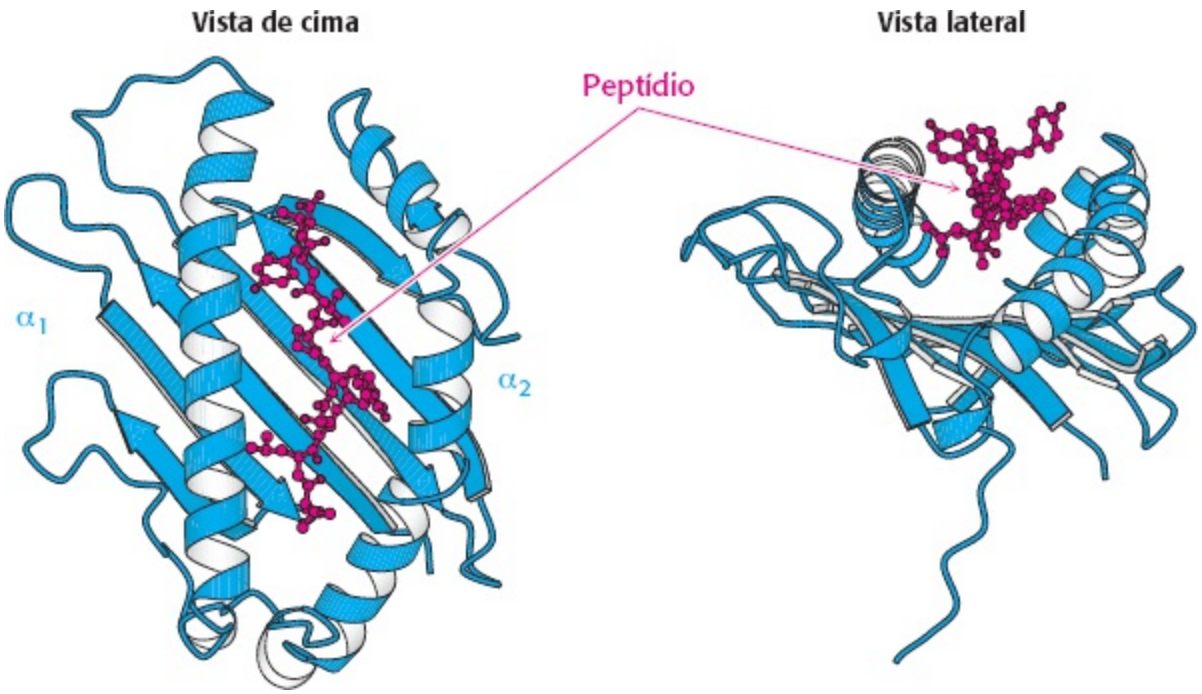


Figura 34.26 Sítio de ligação de peptídio do MHC da classe I. Os domínios α_1 e α_2 juntam-se para formar um sulco no qual os peptídios são apresentados. *Observe* que o peptídio é circundado em três lados por uma fita β e duas α-hélices, sendo acessível pela parte superior da estrutura. [Desenhada a partir de 1HHK.pdb.]

O sulco pode ser preenchido por um peptídio de 8 a 10 resíduos de comprimento na conformação distendida. Como veremos adiante (p. 1006), as proteínas do MHC são notavelmente diversas na população humana; cada indivíduo expressa até seis proteínas do MHC de classe I distintas, e muitas formas diferentes são encontradas em diferentes pessoas. A primeira estrutura determinada, HLA-A2, liga-se a peptídios que quase sempre apresentam leucina na segunda posição e valina na última (Figura 34.27). As cadeias laterais da molécula do MHC interagem com as extremidades aminoterminal e carboxiterminal e com as cadeias laterais nessas duas posições-chave. Esses dois resíduos são frequentemente designados como *resíduos de ancoragem*. Os outros resíduos são altamente variáveis. Por conseguinte, podem ser apresentados muitos milhões de peptídios diferentes por essa proteína particular do MHC de classe I; as identidades de apenas dois dos nove resíduos são cruciais para a ligação. Cada classe de moléculas do MHC requer um conjunto exclusivo de resíduos de ancoragem. Assim, essas moléculas podem apresentar uma enorme variedade de peptídios. Observe que *uma face do peptídio ligado fica exposta à solução, onde pode ser examinada por outras moléculas, particularmente os receptores de células T*. Outra característica notável dos complexos MHC-peptídio reside na sua estabilidade cinética; uma vez ligado, um peptídio não é liberado, mesmo depois de um período de vários dias.

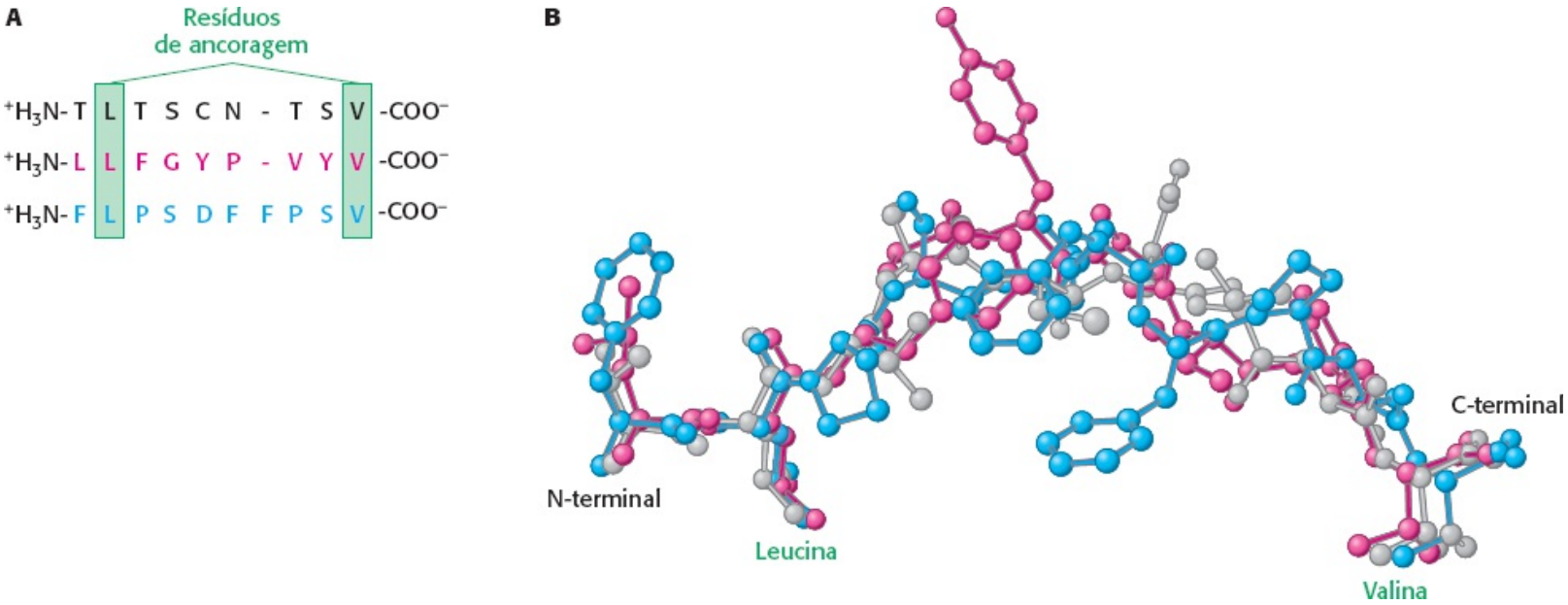


Figura 34.27 Resíduos de ancoragem. A. São mostradas as sequências de aminoácidos de três peptídios que se ligam à proteína MHC da classe I, HLA-A2. Cada um desses peptídios apresenta leucina na segunda posição e valina na posição carboxiterminal. **B**. A comparação das estruturas desses peptídios revela que as extremidades aminoterminal e carboxiterminal, bem como as cadeias laterais dos resíduos de leucina e valina, estão essencialmente na mesma posição em cada peptídio, enquanto o restante das estruturas é muito diferente.

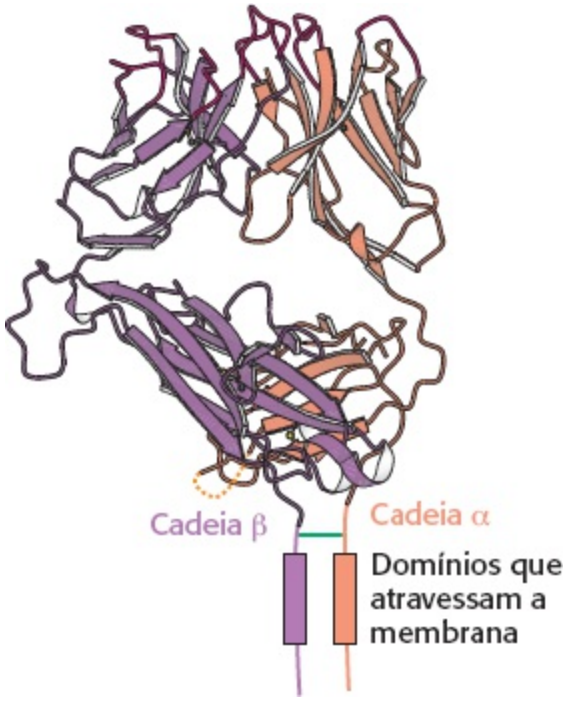


Figura 34.28 Receptor de célula T. Essa proteína consiste em uma cadeia α e uma cadeia β, ligadas por uma ponte de dissulfeto. *Observe* que cada cadeia é constituída de dois domínios de imunoglobulina na superfície celular, um domínio que atravessa a membrana de um lado a outro e uma cauda citoplasmática curta. [Desenhada a partir de 1BD2.pdb.]

Os receptores de células T são proteínas semelhantes a anticorpos que contêm regiões variáveis e constantes

Agora, estamos prontos para considerar o receptor que reconhece peptídios apresentados por proteínas do MHC nas células-alvo. O *receptor de células T* é constituído de uma cadeia α de 43 kDa unida por uma ponte de dissulfeto a uma cadeia β de 43 kDa (Figura 34.28). Cada cadeia atravessa a membrana plasmática de um lado a outro e apresenta uma região carboxiterminal curta no lado citoplasmático. Uma pequena proporção de células T expressa um receptor que consiste em cadeias γ e δ, em lugar das cadeias α e β. As cadeias α e β do receptor de células T, à semelhança das cadeias L e H das imunoglobulinas, consistem em regiões *variáveis* e *constantes*. Com efeito, *esses domínios do receptor de células T são homólogos aos domínios V e C das imunoglobulinas*. Além disso, sequências hipervariáveis presentes nas regiões V das cadeias α e β do receptor de células T formam o sítio de ligação para o epítopo.

A arquitetura genética dessas proteínas assemelha-se àquela das imunoglobulinas, embora a diversidade genética dos anticorpos esteja distribuída por todas as alças CDR, enquanto a diversidade genética dos receptores de células T concentra-se na alça CDR3 que interage com o peptídio ligado ao MHC. A região variável da cadeia α do receptor de células T é codificada por cerca de 50 segmentos gênicos V e 70 segmentos gênicos J. A cadeia β do receptor de células T é codificada por dois segmentos gênicos D, além de 57 segmentos gênicos V e 13 segmentos J. Mais uma vez, a diversidade dos segmentos gênicos e o uso de modos ligeiramente imprecisos de uni-los aumentam a quantidade de proteínas distintas formadas. *Pelo menos 10^{12} especificidades diferentes podem surgir a partir das combinações desse repertório de genes*. Por conseguinte, os receptores de células T, à semelhança das imunoglobulinas, podem reconhecer uma quantidade muito grande de epítopos diferentes. Todos os receptores de determinada célula T apresentam a mesma especificidade.

Como as células T reconhecem seus alvos? As regiões variáveis das cadeias α e β do receptor de células T formam um sítio de ligação que reconhece a combinação de um epítopo-peptídio exógeno ligado a uma proteína do MHC (Figura 34.29). Nem o peptídio exógeno por si só nem a proteína do MHC isoladamente formam um complexo com o receptor de células T. Por conseguinte, fragmentos de um patógeno intracelular são apresentados em um contexto que possibilita a sua detecção, levando ao início de uma resposta apropriada.

A CD8 nas células T citotóxicas atua em conjunto com receptores de células T

O receptor de célula T não atua isoladamente no reconhecimento e na mediação do destino das células-alvo. As células T citotóxicas também expressam uma proteína, denominada *CD8*, em sua superfície, que é crucial para o reconhecimento do complexo MHC da classe I-peptídio. A abreviatura *CD* provém do termo *grupo de diferenciação (do inglês cluster of differentiation)* e refere-se a um marcador de superfície celular que é utilizado para identificar uma linhagem ou estágio de diferenciação. Os anticorpos específicos para determinadas proteínas CD têm sido valiosos para acompanhar o desenvolvimento dos leucócitos e descobrir novas interações entre tipos celulares específicos.

Figura 34.29 Complexo de receptor de célula T – MHC da classe I. O receptor de célula T liga-se a uma proteína MHH da classe I contendo um peptídio ligado. *Observe* que o receptor de célula T entra em contato tanto com a proteína MHC quanto com o peptídio. [Desenhada a partir de 1BD2.pdb.]

Cada cadeia no dímero de CD8 contém um domínio que se assemelha a um domínio variável de imunoglobulina (Figura 34.30). A CD8 interage principalmente com o domínio α_3 constante das

proteínas do MHC da classe I. Essa interação estabiliza ainda mais as interações entre a célula T e o seu alvo. A cauda citoplasmática de CD8 contém um local de atracagem para a Lck, uma tirosina quinase plasmática semelhante a Src. O próprio receptor de células T está associado a seis polipeptídios que formam o complexo CD3 (Figura 34.31). As cadeias γ, δ e ε de CD3 são homólogas à Ig-α e Ig-β associadas ao receptor de células B (Figura 34.20); cada cadeia consiste em um domínio de imunoglobulina extracelular e em uma região ITAM intracelular. Essas cadeias associam-se em heterodímeros CD3- e CD3-δε. Um componente adicional, a cadeia CD3-ζ, tem apenas um pequeno domínio extracelular e um domínio intracelular maior contendo três sequências ITAM.

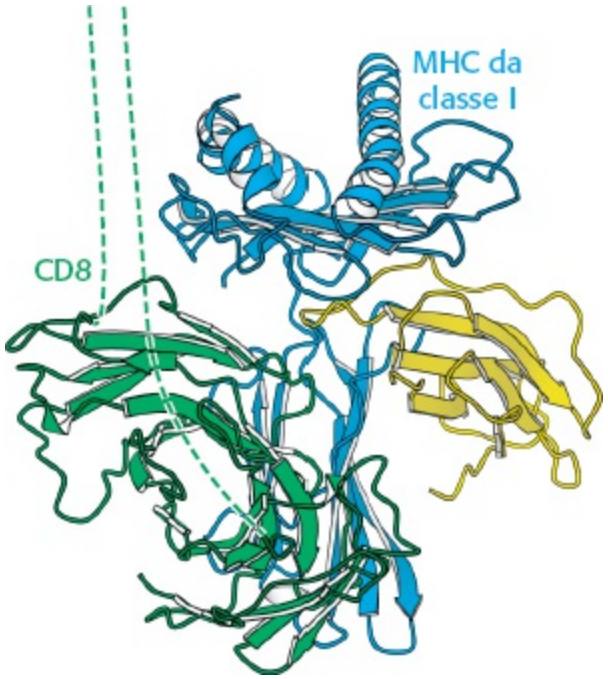


Figura 34.30 Correceptor CD8. A proteína dimérica estende-se a partir da superfície de uma célula T citotóxica e liga-se a moléculas MHC da classe I que são expressas na superfície da célula que está ligada à célula T. As linhas tracejadas representam cadeias polipeptídicas distendidas que ligam os domínios de imunoglobulina de CD8 à membrana. *Observe* que o correceptor interage principalmente com o domínio α constante do domínio MHC da classe I. [Desenhada a partir de 1AKJ.pdb.]

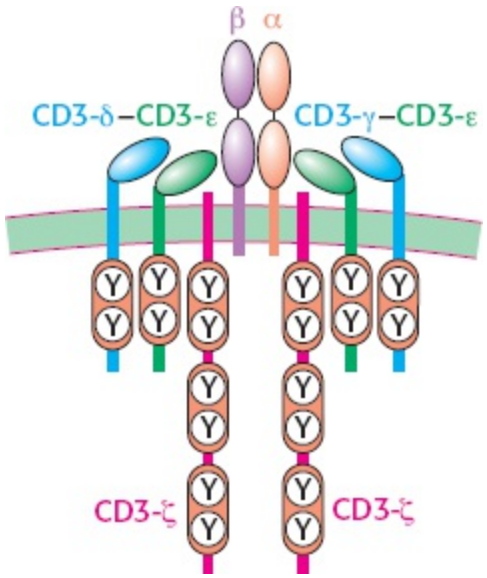


Figura 34.31 Complexo do receptor de célula T. O receptor de célula T está associado a seis moléculas CD3: um heterodímero CD3-γ-CD3-ε, um heterodímero CD3-δ-CD3-ε e duas cadeias de CD3-ζ. Existem sequências únicas de ITAM

nos domínios citoplasmáticos de CD3-γ, CD3-δ e CD3-ε, enquanto três dessas sequências são encontradas em cada cadeia CD3-ζ.

Com base nesses componentes, é possível conceber um modelo para a ativação das células T estreitamente paralelo à via de ativação das células B (Seção 34.3; Figura 34.32). A ligação do receptor de célula T ao complexo MHC da classe I-peptídio e a ligação concomitante de CD8 da célula T à molécula do MHC estabelecem uma ligação entre a quinase Lck e os substratos ITAM dos componentes do complexo CD3. A fosforilação dos resíduos de tirosina nas sequências de ITAM produz locais de atracagem para uma proteína quinase, denominada ZAP-70 (proteína associada à *z*eta [do inglês, ***z**eta-**a**ssociated **p**rotein*]) de 70 kDa), que é homóloga a Syk nas células B. A ZAP-70, atracada pelos seus dois domínios SH2, fosforila alvos distais na cascata de sinalização. Outras moléculas, incluindo uma proteína fosfatase ligada à membrana, denominada CD45, e uma proteína de superfície celular, denominada CD28, desempenham funções auxiliares nesse processo.

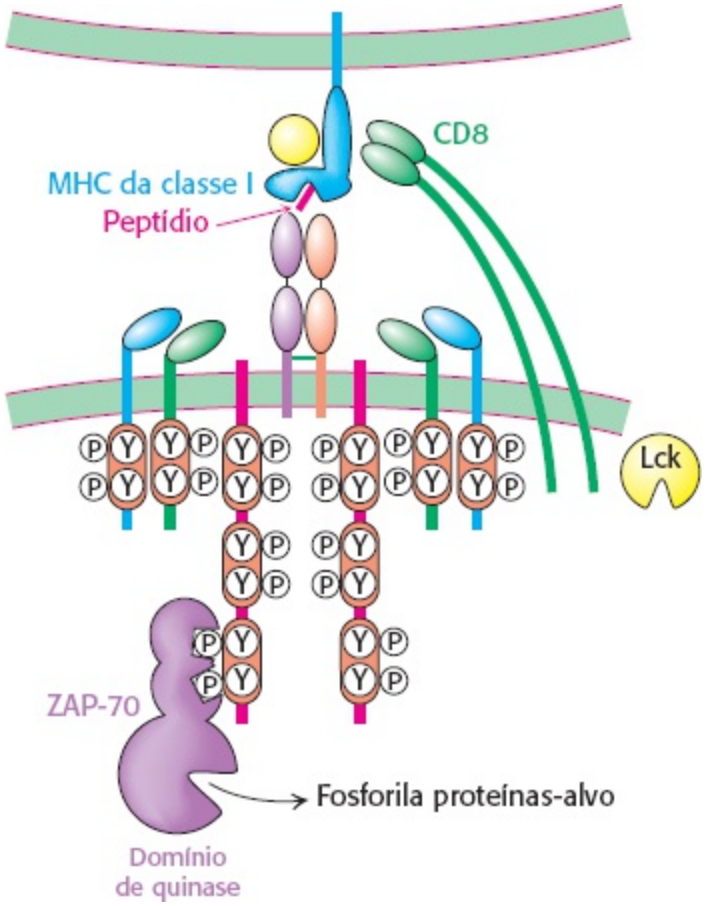


Figura 34.32 Ativação da célula T. A interação entre o receptor de célula T e um complexo MHC da classe I-peptídio resulta na ligação de CD8 à proteína do MHC, no recrutamento da tirosino quinase Lck e na fosforilação de resíduos de tirosina nas sequências ITAM das cadeias CD3. Após fosforilação, as regiões de ITAM atuam como locais de atracagem para a proteína quinase ZAP-70, que fosforila alvos proteicos para transmitir o sinal.

A ativação das células T tem duas consequências importantes. Em primeiro lugar, a ativação das células T citotóxicas resulta na secreção de várias proteínas, incluindo a *perforina* e *granzimas*. A perforina é uma proteína de 70 kDa que desestabiliza a membrana plasmática da célula-alvo, possibilitando a entrada de *granzimas* no citoplasma da célula-alvo. As granzimas são serina proteases (Seção 9.1), que iniciam a via da apoptose, levando à morte da célula-alvo e à fragmentação de seu DNA, incluindo qualquer DNA viral que possa estar presente. Em segundo

lugar, após ter estimulado a sua célula-alvo a cometer suicídio, a célula T ativada separa-se e é estimulada a se reproduzir. Assim, são produzidas células T adicionais que expressam o mesmo receptor de célula T para continuar a batalha contra o invasor após essas células T terem sido identificadas como armas apropriadas.

As células T auxiliares estimulam células que apresentam peptídios exógenos ligados a proteínas MHC da classe II

Nem todas as células T são citotóxicas. *As células T auxiliares, que constituem uma classe diferente, estimulam a proliferação de linfócitos B específicos e células T citotóxicas, atuando, assim, como parceiros na determinação das respostas imunes que são produzidas*. A importância das células T auxiliares é graficamente revelada pela devastação causada pela AIDS, uma condição que destrói essas células. As células T auxiliares, à semelhança das células T citotóxicas, detectam peptídios exógenos que são apresentados nas superfícies celulares por proteínas do MHC. Entretanto, a fonte dos peptídios, as proteínas do MHC que se ligam a eles e a via de transporte são diferentes.

As células T auxiliares reconhecem peptídios ligados a moléculas do MHC, denominadas de classe II. Sua ação auxiliar é dirigida para as células B, os macrófagos e as células dendríticas. *As proteínas do MHC de classe II são expressas apenas por essas células apresentadoras de antígenos*, diferentemente das proteínas do MHC da classe I, que são expressas em quase todas as células. Os peptídios apresentados pelas proteínas do MHC da classe II não provêm do citoplasma. Na verdade, *surgem da degradação de proteínas que foram internalizadas por endocitose*. Considere, por exemplo, uma partícula viral que é capturada por imunoglobulinas ligadas à membrana na superfície de uma célula B (Figura 34.33). Esse complexo é levado até um endossomo, um compartimento ácido circundado por membrana, onde é digerido. Os peptídios resultantes associam-se a proteínas do MHC da classe II, que se movem até a superfície da célula. Os peptídios do citoplasma não podem alcançar as proteínas de classe II, enquanto os peptídios de compartimentos endossômicos não podem alcançar as proteínas de classe I. Essa segregação de peptídios apresentados é biologicamente crítica. A associação de um peptídio exógeno a uma proteína do MHC da classe II sinaliza que uma célula *encontrou* um patógeno e atua como pedido de *auxílio*. Por outro lado, a associação a uma proteína do MHC da classe I sinaliza que uma célula *sucumbiu* a um patógeno e representa um chamado para *destruição*.

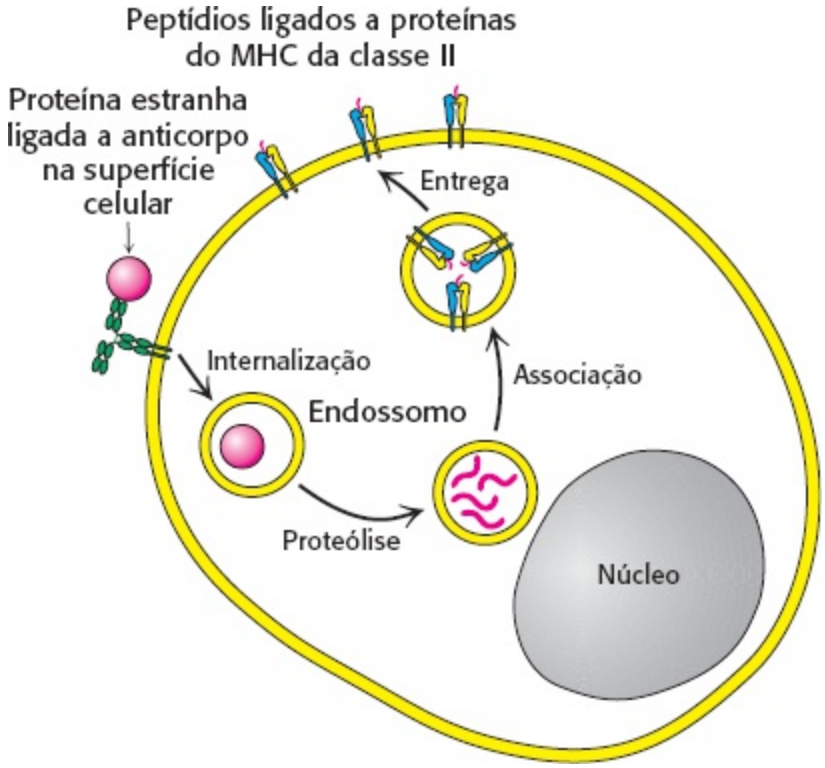


Figura 34.33 Apresentação de peptídios de proteínas internalizadas. As células apresentadoras de antígenos ligam-se a proteínas estranhas e as internalizam, e apresentam peptídios que são formados a partir da digestão dessas proteínas, associados a proteínas do MHC da classe II.

As células T auxiliares dependem do receptor de célula T e da CD4 para reconhecer peptídios exógenos nas células apresentadoras de antígeno

A estrutura global de uma molécula MHC da classe II é notavelmente semelhante àquela de uma molécula da classe I. As moléculas da classe II consistem em uma cadeia α de 33 kDa e em uma cadeia β de 30 kDa ligada de modo não covalente (Figura 34.34). Cada uma delas contém dois domínios extracelulares, um segmento transmembranar e uma cauda citoplasmática curta. O sítio de ligação do peptídio é formado pelos domínios α_1 e β_1, contribuindo, cada um deles, com uma longa hélice e parte de uma fita β. Por conseguinte, os mesmos elementos estruturais estão presentes nas moléculas MHC da classe I e da classe II, porém são combinados de modos diferentes em cadeias polipeptídicas. O sítio de ligação de peptídio de uma molécula da classe II está aberto em ambas as extremidades, de modo que esse sulco pode acomodar peptídios mais longos do que os que podem ser ligados por moléculas da classe I; tipicamente, são ligados peptídios entre 13 e 18 resíduos. A especificidade de ligação de peptídios de cada molécula da classe II depende de bolsas de ligação que reconhecem determinados aminoácidos, também conhecidos como resíduos de ancoragem, em posições específicas ao longo da sequência.

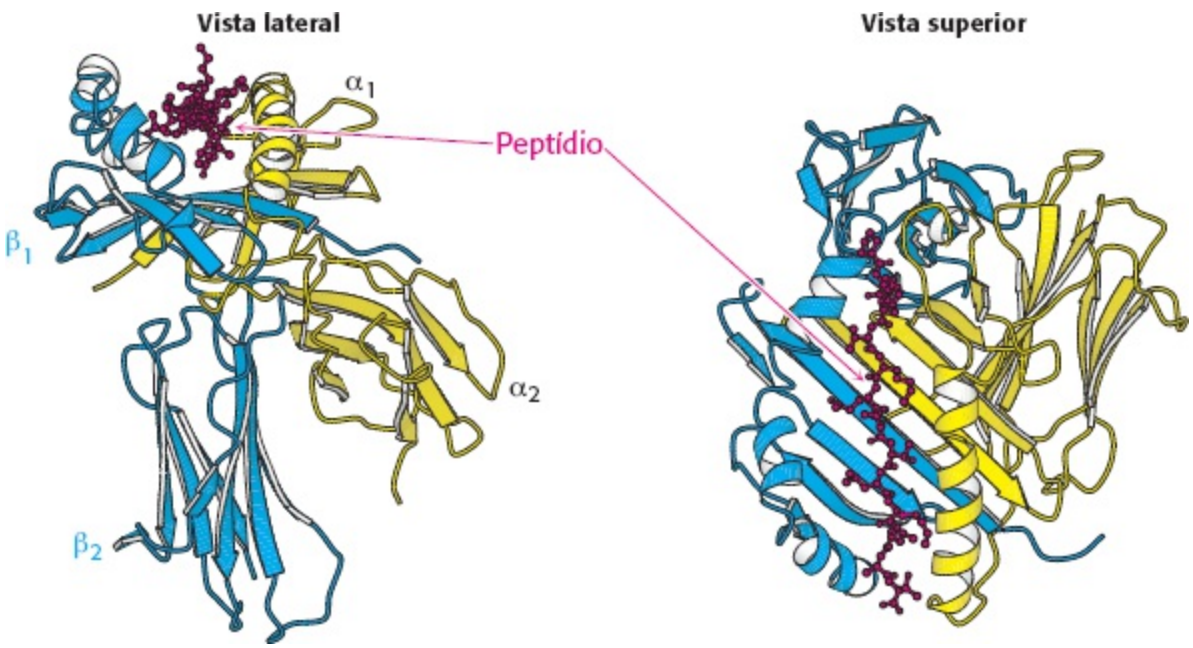


Figura 34.34 Proteína do MHC da classe II. Uma proteína do MHC da classe II consiste em cadeias α e β homólogas, apresentando, cada uma delas, um domínio aminoterminal que constitui metade da estrutura de ligação do peptídio, bem como um domínio de imunoglobulina carboxiterminal. *Observe* o sítio de ligação de peptídio semelhante a uma depressão, que se assemelha ao das proteínas MHC da classe I, exceto por estar aberto em ambas as extremidades, possibilitando a ligação das proteínas MHC da classe II a peptídios mais longos do que aqueles ligados pela classe I. [Desenhada a partir de 1 DLH.pdb.]

As células T auxiliares expressam receptores de células T que são produzidos pelos mesmos genes que os das células T citotóxicas. Esses receptores de células T interagem com moléculas MHC da classe II de modo análogo à interação dos receptores de células T com moléculas MHC da classe I. Entretanto, as células T auxiliares e as células T citotóxicas são diferenciadas por outras proteínas expressas em suas superfícies. Em particular, as células T auxiliares expressam uma proteína denominada CD4 em lugar de expressar CD8. A *CD4 c*onsiste em quatro domínios de imunoglobulina que se estendem a partir da superfície da célula T, bem como em uma pequena região citoplasmática (Figura 34.35). Os domínios aminoterminais de imunoglobulina da CD4 interagem com a base na molécula MHC da classe II. Por conseguinte, as células T auxiliares ligam-se a células que expressam especificamente MHC da classe II, devido às interações com CD4 (Figura 34.36).

Figura 34.35 Correceptor CD4. Essa proteína é constituída de quatro domínios de imunoglobulina em série, que se estendem a partir da superfície de uma célula T auxiliar. [Desenhada a partir de 1WIO.pdb.]

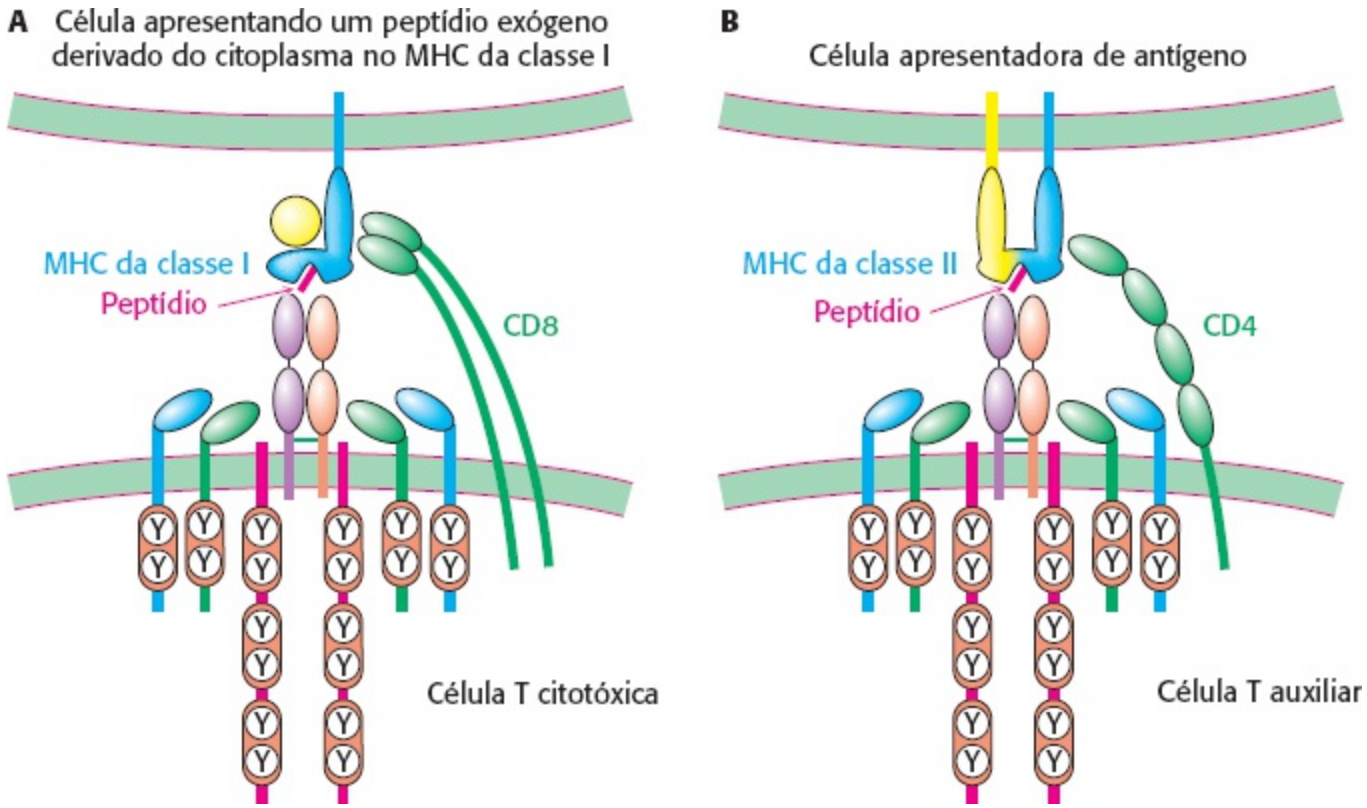


Figura 34.36 Variações sobre um tema. A. As células T citotóxicas reconhecem peptídios exógenos apresentados em proteínas do MHC da classe I com o auxílio do correceptor CD8. **B**. As células T auxiliares reconhecem peptídios apresentados em proteínas do MHC da classe II por células apresentadoras de antígeno especializadas, com o auxílio do correceptor CD4.

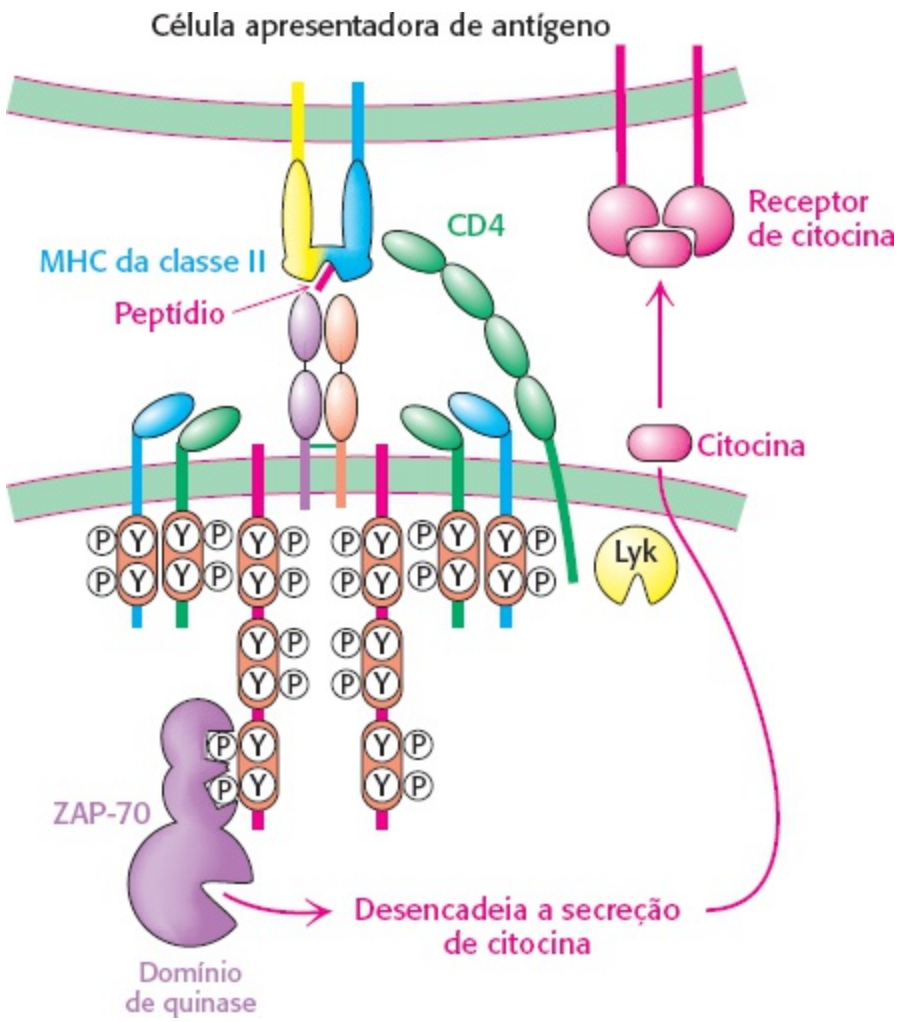


Figura 34.37 Ação da célula T auxiliar. O engajamento do receptor de células T nas células T auxiliares resulta na secreção de citocinas. Essas citocinas se ligam a receptores de citocinas expressos na superfície da célula apresentadora de antígeno, estimulando o crescimento e a diferenciação da célula e, no que concerne à célula B, a secreção de anticorpos.

Quando uma célula T auxiliar se liga a uma célula apresentadora de antígeno que expressa um complexo MHC de classe II-peptídio apropriado, vias de sinalização análogas àquelas das células T citotóxicas são iniciadas pela ação da quinase Lck em ITAM nas moléculas CD3 associadas ao receptor de células T. Todavia, em vez de desencadear eventos que levam à morte da célula ligada, *essas vias de sinalização resultam na secreção de citocinas pela célula auxiliar*. As citocinas constituem uma família de moléculas que incluem, entre outras, a interleucina-2 e a interferona-γ. As citocinas ligam-se a receptores específicos na célula apresentadora de antígeno e estimulam o crescimento, a diferenciação e, no que concerne aos plasmócitos, que derivam das células B, a secreção de anticorpos (Figura 34.37). Por conseguinte, a internalização e a apresentação de partes de um patógeno estranho ajudam a produzir um ambiente onde as células que atuam na defesa contra esse patógeno podem se desenvolver pela ação das células T auxiliares.

As proteínas do MHC são altamente diversificadas

As proteínas do MHC das classes I e II, as apresentadoras de peptídios às células T, foram descobertas em virtude de seu papel na *rejeição de transplantes*. Um tecido transplantado de uma pessoa para outra ou de um camundongo para outro é habitualmente rejeitado pelo sistema imunológico. Em contrapartida, os tecidos transplantados de um gêmeo idêntico para outro ou entre

camundongos de uma linhagem endogâmica, são aceitos. As análises genéticas revelaram que a rejeição ocorre quando os tecidos são transplantados entre organismos que apresentam genes diferentes no complexo principal de histocompatibilidade, um grupo de mais de 75 genes que desempenham papéis essenciais na imunidade. O segmento de 3.500 kb do MHC é quase do tamanho de todo o cromossomo de *E. coli*. O MHC codifica proteínas da classe I (apresentadoras a células T citotóxicas) e da classe II (apresentadoras a células T auxiliares), bem como proteínas da classe III (componentes da cascata do sistema complemento) e muitas outras proteínas que desempenham papéis essenciais na imunidade.

Os seres humanos expressam seis genes diferentes da classe I (três de cada genitor) e seis genes diferentes da classe II. Os três *loci* para genes da classe I são denominados HLA-A, -B e -C, e aqueles para os genes da classe II são denominados HLA-DP, -DQ e -DR. Esses *loci* são *altamente polimórficos*: muitos alelos de cada um deles estão presentes na população. Por exemplo, são conhecidos mais de 50 alelos de cada um dos HLA-A, -B e -C; a quantidade descoberta aumenta a cada ano. Por conseguinte, a probabilidade de que duas pessoas não aparentadas tenham proteínas da classe I e da classe II idênticas é muito pequena ($< 10^{-4}$), explicando a rejeição de transplantes, a não ser que os genótipos do doador e do receptor sejam de antemão estreitamente tipados.

As diferenças entre as proteínas da classe I estão situadas principalmente nos domínios α_1 e α_2, que formam o sítio de ligação de peptídios (Figura 34.38). O domínio α_3, que interage com uma β_2-microglobulina constante, é em grande parte conservado. De modo semelhante, as diferenças entre as proteínas da classe II aglomeram-se próximo ao sulco de ligação de peptídios. Por que as proteínas do MHC são tão variáveis? *Sua diversidade possibilita a apresentação de uma gama muito ampla de peptídios às células T*. Uma *determinada* molécula da classe I ou da classe II pode não ser capaz de se ligar a nenhum dos fragmentos peptídicos de uma proteína viral. A probabilidade de um encaixe aumenta acentuadamente pela existência de vários tipos (habitualmente seis) de cada classe de apresentadores em cada organismo. Se todos os membros de uma espécie tivessem moléculas idênticas da classe I ou da classe II, a população seria muito mais vulnerável à devastação por um patógeno que tivesse mutado, escapando, assim, da apresentação. A evolução de um repertório diversificado do MHC humano foi impulsionada pela seleção de membros individuais da espécie que resistem a infecções às quais outros membros da população podem ser suscetíveis.

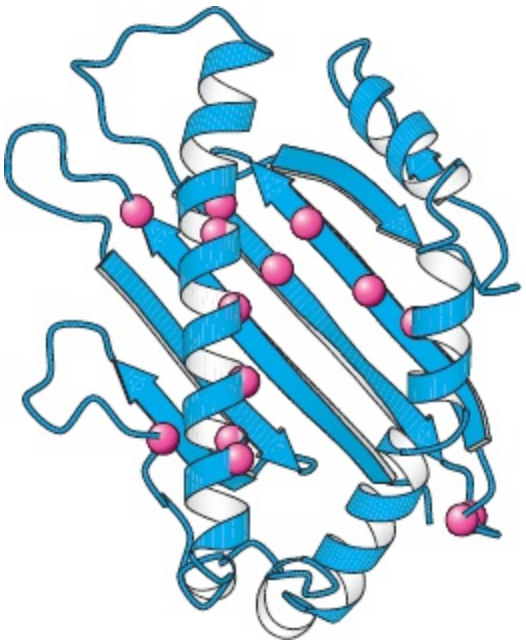


Figura 34.38 Polimorfismo nas proteínas MHC da classe I. *Observe* que as posições dos sítios com alto grau de polimorfismo na população humana estão ilustradas como esferas vermelhas na estrutura da parte aminoterminal da proteína do MHC da classe I. [Desenhada a partir de 1HHK.pdb.]

Os vírus da imunodeficiência humana subvertem o sistema imunológico, destruindo as células T auxiliares

Em 1981, foram reconhecidos os primeiros casos de uma nova doença, hoje em dia denominada *síndrome de imunodeficiência humana* (AIDS, *do inglês acquired immune deficiency syndrome*). As vítimas morriam de infecções raras, visto que seus sistemas imunológicos estavam danificados. A causa foi identificada 2 anos depois por Luc Montagnier e colaboradores. A AIDS é produzida pelo *vírus da imunodeficiência humana* (HIV, *do inglês human immunodeficiency virus*), do qual são conhecidas duas classes principais: o HIV-1 e o HIV-2, muito menos comum. À semelhança de outros *retrovírus*, o HIV contém um genoma de RNA de fita simples, que sofre replicação por meio de um DNA intermediário de dupla fita. Esse DNA viral torna-se integrado ao genoma da célula hospedeira. Com efeito, os genes virais são transcritos apenas quando estão integrados ao DNA do hospedeiro.

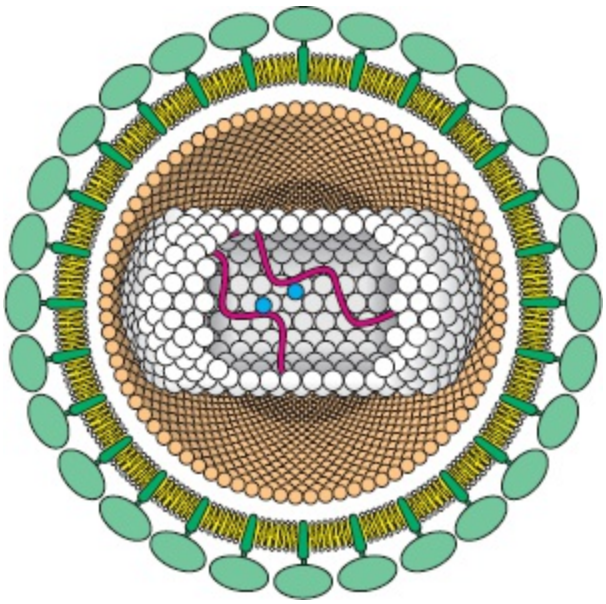


Figura 34.39 Vírus da imunodeficiência humana. Essa representação esquemática do HIV revela seus componentes: proteínas e ácido nucleico. As glicoproteínas gp41 e gp120 do envelope da membrana são mostradas em verde-escuro e verde-claro. O RNA viral aparece em vermelho, enquanto as moléculas de transcriptase reversa estão em azul. [De R. C. Gallo. The AIDS virus. Copyright © 1987 by Scientific American, Inc. Todos os direitos reservados.]

O vírion do HIV é envelopado por uma membrana de bicamada lipídica contendo duas glicoproteínas: a gp41, que atravessa a membrana de um lado ao outro, está associada à gp120, que está localizada na face externa (Figura 34.39). O cerne do vírus contém duas cópias do genoma de RNA e RNA de transferência associados, bem como várias moléculas de transcriptase reversa. São circundados por numerosas cópias de duas proteínas denominadas p18 e p24. *A célula hospedeira para o HIV é a célula T auxiliar*. As moléculas de gp120 na membrana do HIV ligam-se às moléculas CD4 na superfície da célula T auxiliar (Figura 34.40). Em virtude dessa interação, a gp41 viral associada insere a sua cabeça aminoterminal na membrana da célula hospedeira. Ocorre a fusão da membrana viral com a membrana da célula T auxiliar, e o cerne viral é liberado diretamente no

citoplasma. A infecção pelo HIV leva à destruição das células T auxiliares, visto que a permeabilidade da membrana plasmática da célula hospedeira é acentuadamente aumentada pela inserção das glicoproteínas virais e pelo brotamento de partículas de vírus. O influxo de íons e de água perturba o equilíbrio iônico, causando lise osmótica.

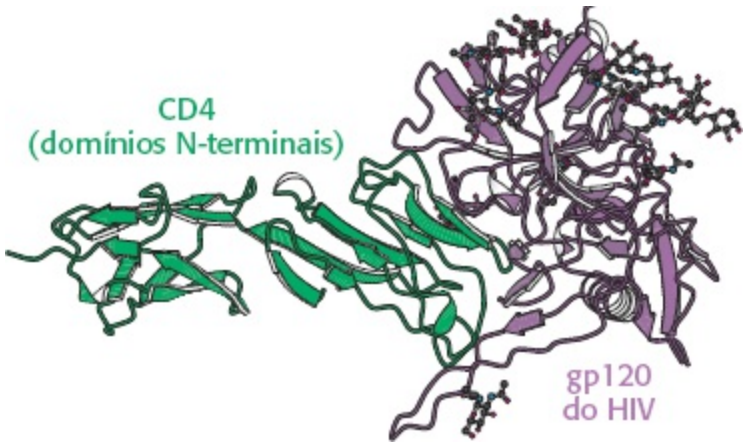


Figura 34.40 Receptor do HIV. Um complexo entre uma forma modificada da glicoproteína gp120 do envelope do HIV e um peptídio que corresponde aos dois domínios aminoterminais da proteína CD4 da célula T auxiliar revela como a infecção viral das células T auxiliares é iniciada. [Desenhada a partir de 1GG1.pdb.]

34.5 O sistema imunológico contribui para a prevenção e o desenvolvimento de doenças humanas

A principal função do sistema imunológico consiste em proteger o hospedeiro contra a invasão por organismos estranhos. Entretanto, como o sistema imunológico evita atacar seu próprio organismo? Em outras palavras, como ele distingue entre o próprio e o não próprio? Evidentemente, as proteínas do próprio organismo não apresentam marcadores especiais que as identifiquem. Em vez disso, os processos de seleção nas etapas iniciais das vias de desenvolvimento das células imunes matam ou suprimem as células imunes que reagem fortemente com autoantígenos. O paradigma evolutivo ainda se aplica; são produzidas células imunes que reconhecem autoantígenos, mas mecanismos seletivos eliminam essas células durante o desenvolvimento.

As células T estão sujeitas à seleção positiva e negativa no timo

O nome das células T provém do local de sua produção, o timo, um pequeno órgão situado logo acima do coração. O exame das vias de desenvolvimento que levam à produção de células T citotóxicas e auxiliares maduras revela os mecanismos de seleção que são cruciais para distinguir o próprio do não próprio. Esses critérios de seleção são muito rígidos. Aproximadamente 98% dos timócitos, os precursores das células T, morrem antes de completar o processo de maturação.

Os timócitos produzidos na medula óssea não expressam o complexo de receptor de células T, CD4, ou CD8. Com o seu deslocamento para o timo e o rearranjo dos genes dos receptores de células T, o timócito imaturo passa a expressar todas essas moléculas. Essas células são inicialmente submetidas à *seleção positiva* (Figura 34.41). As células cujos receptores de células T podem ligar-se com razoável afinidade a moléculas MHC da classe I ou da classe II sobrevivem a essa seleção; aquelas cujos receptores de células T não participam desse tipo de interação sofrem apoptose e

morrem. *O papel da etapa de seleção positiva consiste em impedir a produção de células T que não irão se ligar a qualquer complexo MHC presente, independentemente do peptídio ligado.*

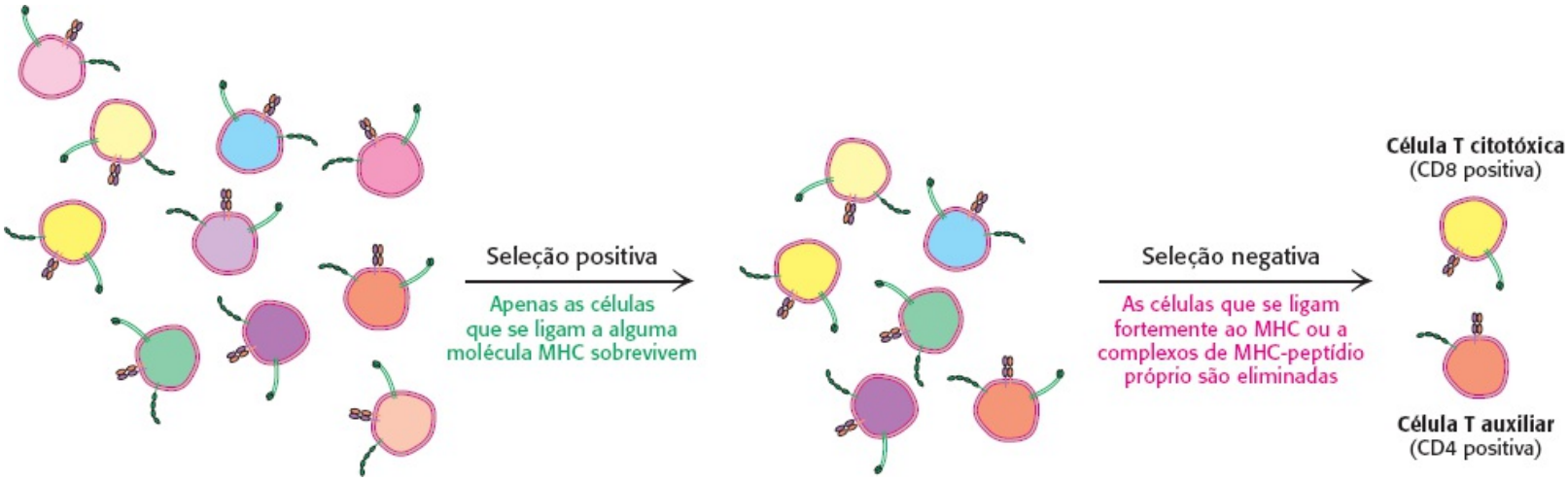


Figura 34.41 Seleção de células T. Uma população de timócitos é inicialmente submetida à seleção positiva para remover as células que expressam receptores de células T que não irão se ligar a proteínas do MHC expressas pelo organismo do indivíduo. As células sobreviventes são então submetidas à seleção negativa para remover as células que se ligam fortemente a complexos do MHC ligados a peptídios próprios.

A população de células que sobrevive à seleção positiva é submetida a uma segunda etapa, a *seleção negativa*. Nessa etapa, as células T que se ligam com alta afinidade a complexos MHC ligados a autopeptídios expressos nas superfícies de células apresentadoras de antígeno no timo sofrem apoptose ou são de outro modo suprimidas. As que não se ligam tão avidamente a qualquer um desses complexos MHC completam o seu desenvolvimento e tornam-se células T citotóxicas maduras (que expressam apenas CD8) ou células T auxiliares maduras (que expressam apenas CD4). A etapa de seleção negativa leva à *autotolerância*; as células que se ligam a um complexo MHC-autopeptídio são removidas da população de células T. Mecanismos semelhantes são observados para as células B em desenvolvimento, suprimindo as células B que expressam anticorpos que interagem fortemente com antígenos próprios.

As doenças autoimunes resultam da produção de respostas imunes contra antígenos próprios

Embora a seleção tímica seja notavelmente eficiente na supressão da resposta imune a autoantígenos, ocorrem falhas. Essas falhas resultam em *doenças autoimunes*. Esses distúrbios incluem doenças comuns, como diabetes melito insulinodependente, esclerose múltipla e artrite reumatoide. Nesses casos, as respostas imunes contra antígenos próprios resultam em lesão de tecidos seletivos que expressam o antígeno (Figura 34.42).

Em muitos casos, a causa da produção de anticorpos ou células T autorreativos não está bem esclarecida. Todavia, em outros casos, microrganismos infecciosos, como bactérias ou vírus, podem desempenhar algum papel. A infecção leva à produção de anticorpos e células T que reagem com numerosos epítopos diferentes do microrganismo infeccioso. Se um desses antígenos tiver uma estreita semelhança com um antígeno próprio, pode ocorrer uma resposta autoimune. Por exemplo, as infecções por *Streptococcus* algumas vezes resultam em febre reumática, devido à produção de anticorpos contra antígenos estreptocócicos que apresentam reação cruzada com epítopos expostos

no músculo cardíaco.

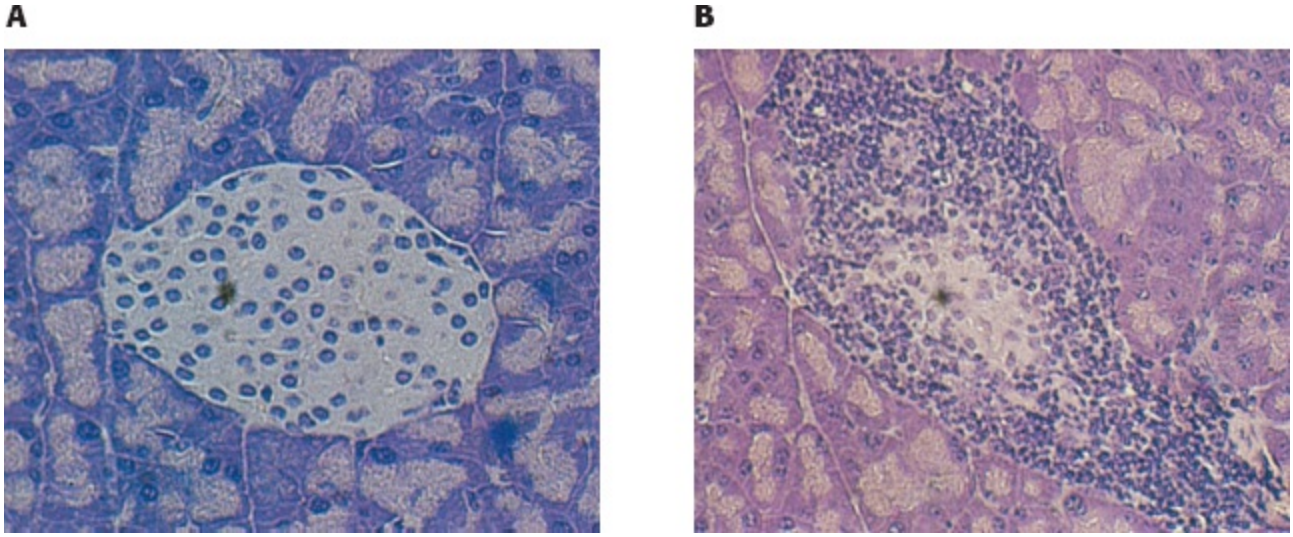


Figura 34.42 Consequências da autoimunidade. Microfotografias de uma ilhota de Langerhans (**A**) no pâncreas de um camundongo normal e (**B**) no pâncreas de um camundongo com resposta imune contra as células β do pâncreas, resultando em uma doença que se assemelha ao diabetes melito insulinodependente nos seres humanos. *Observe* que a área celular relativamente pálida no centro da micrografia em A fica ocupada pelos núcleos escuros de células inflamatórias em B. [De M. A. Atkinson and N.K. Maclaren. What causes diabetes? Copyright © 1990 by Scientific American, Inc. Todos os direitos reservados.]

O sistema imune desempenha um papel na prevenção do câncer

O desenvolvimento de respostas imunes contra proteínas codificadas por nossos próprios genomas pode ser benéfico em algumas circunstâncias. As células cancerosas sofrem mudanças significativas, que frequentemente resultam na expressão de proteínas que normalmente não são expressas. Por exemplo, a mutação de genes pode gerar proteínas que não correspondem a qualquer proteína normal na sua sequência de aminoácidos. Essas proteínas podem ser reconhecidas como estranhas, e ocorrerá uma resposta imune dirigida especificamente contra a célula cancerosa. De modo alternativo, as células cancerosas frequentemente produzem proteínas que são expressas durante o desenvolvimento embrionário, mas que não são expressas, ou o são em níveis muito baixos, depois do nascimento. Por exemplo, uma glicoproteína de membrana, denominada *antígeno carcinoembrionário* (CEA, do inglês *carcinoembryonic antigen*), aparece nas células gastrintestinais do feto em desenvolvimento, porém normalmente não é expressa em níveis significativos depois do nascimento. Mais de 50% dos pacientes com câncer colorretal apresentam níveis séricos elevados de CEA. As células imunes que reconhecem epítopos dessas proteínas não estarão sujeitas à seleção negativa e, portanto, estarão presentes no repertório imunológico do adulto. Essas células podem desempenhar um papel de vigilância contra o câncer, matando as células que hiperexpressam antígenos como o CEA e impedindo o desenvolvimento de células geneticamente danificadas em tumores.

As vacinas constituem um poderoso meio de impedir e erradicar doenças

A descoberta e a utilização das *vacinas, isto é*, preparações biológicas que estimulam a imunidade contra determinado patógeno ou doença, representam um avanço significativo na história

da medicina moderna. O trabalho pioneiro de Edward Jenner e Louis Pasteur nos séculos 18 e 19 revelou que a inoculação de formas inativadas de um patógeno pode proteger o organismo contra uma infecção subsequente por esse patógeno ativo. O tratamento de um indivíduo com uma vacina ou *imunização* leva ao desenvolvimento da *memória imunológica*, que consiste na capacidade do sistema imune de responder mais rapidamente e de modo mais efetivo a patógenos com os quais teve contato prévio. Em nível celular, a memória surge da seleção positiva de células B e de células T que apresentam alta afinidade pelo seu alvo e que persistem no organismo como *células B de memória* e *células T de memória*.

Para que uma vacina seja efetiva, ela precisa desencadear uma resposta protetora sustentada apropriada contra o patógeno-alvo. Por exemplo, patógenos como o *Clostridium tetani*, o agente etiológico do tétano, causam doença pela liberação de proteínas destrutivas, denominadas *toxinas*. Por conseguinte, uma vacina antitetânica efetiva deve desencadear uma forte resposta mediada pelas células B. Em contrapartida, uma vacina destinada a impedir uma doença causada por um patógeno intracelular deve desencadear uma forte resposta mediada pelas células T. O componente ativo de uma vacina responsável pela estimulação dessa resposta imune pode estar presente em muitas formas:

As *vacinas mortas* ou *inativadas* contêm patógenos que se tornaram inócuos mediante tratamento com substâncias químicas ou calor.

As *vacinas vivas atenuadas* contêm patógenos vivos que acumularam mutações, de modo que não são mais virulentos para as células humanas. Essas vacinas são mais comumente obtidas por infecção repetida do patógeno em cultura de células até a perda de sua virulência.

As *vacinas subunitárias* contêm um componente proteico purificado do patógeno. Essas proteínas podem ser isoladas de material infectado (como sangue de pacientes com infecção crônica) ou produzidas por métodos recombinantes.

As *vacinas de toxoides* são utilizadas contra patógenos que empregam uma toxina extracelular para causar doença. Essas vacinas contêm uma forma da toxina que foi inativada mediante tratamento com substâncias químicas ou calor.

A eficiência nos esforços de imunização possibilitou a erradicação global de certas doenças. Em 1966, foram notificados 20 milhões de casos de varíola no mundo inteiro. Em 1980, devido aos esforços coordenados de vacinação nas regiões de doença endêmica, a World Health Assembly declarou a erradicação da varíola. Entretanto, apesar do sucesso das vacinas na prevenção de muitas doenças devastadoras, vários patógenos têm representado um desafio significativo ao desenvolvimento de vacinas. Por exemplo, o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra o HIV tem sido complicado pela diversidade antigênica das cepas do HIV. Como o seu mecanismo de replicação está sujeito a erro, uma população de HIV apresenta constante mudança nas proteínas do envoltório. De fato, a taxa de mutação do HIV é mais de 65 vezes superior àquela do vírus *influenza*. Todavia, a identificação de anticorpos protetores em indivíduos resistentes ao HIV e os avanços no planejamento de vacinas sugerem que ainda existe uma possibilidade real de desenvolvimento de uma vacina efetiva contra o HIV.

Resumo

O sistema imune inato e o sistema imune adaptativo representam duas linhas de defesa contra patógenos. O sistema imune inato tem como alvo características presentes em muitos patógenos diferentes, porém deixa escapar os patógenos que carecem das características-alvo. O sistema imune adaptativo é mais específico e de grande alcance. Para responder efetivamente a uma ampla diversidade de patógenos, esse tipo de sistema imune precisa ser extremamente adaptável. A adaptação pelo sistema imune adaptativo segue os princípios da evolução: ocorre produção de um conjunto enormemente diverso de proteínas potencialmente úteis; a seguir, essas proteínas são submetidas a intensa seleção, de modo que apenas as células que expressam proteínas úteis sobrevivem e continuam o seu desenvolvimento, até que seja gerada uma resposta imune efetiva a um invasor específico.

34.1 Os anticorpos são constituídos de unidades distintas de ligação de antígeno e efetoras

A principal imunoglobulina no soro é a imunoglobulina G. Uma proteína IgG é um heterotetrâmero, com duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. O tratamento das moléculas de IgG com proteases, como a papaína, produz três fragmentos: dois fragmentos F_{ab}, que conservam a atividade de ligação de antígeno, e um fragmento F_c, que conserva a capacidade de ativar funções efetoras, como desencadeamento da cascata do complemento. Os fragmentos F_{ab} incluem a cadeia L e a metade aminoterminal da cadeia H; o domínio F_c é um dímero constituído pelas metades carboxiterminais de duas cadeias H. As cinco classes diferentes de anticorpos – IgG, IgM, IgA, IgD e IgE – diferem nas suas cadeias pesadas e, portanto, nas suas funções efetoras.

34.2 Os anticorpos ligam-se a moléculas específicas por meio de alças hipervariáveis

Muitas das proteínas essenciais do sistema imunológico apresentam um enovelamento de proteína particular. O enovelamento de imunoglobulina consiste em um par de fitas β que se juntam uma contra a outra, ligadas por uma única ponte dissulfeto. As alças que se projetam de uma extremidade da estrutura formam uma superfície de ligação, que pode ser variável devido a mudanças nas sequências de aminoácidos dentro das alças. Domínios com enovelamento de imunoglobulina são ligados para formar anticorpos e outras classes de proteínas do sistema imune, incluindo receptores de células T. Duas cadeias unem-se para formar a superfície de ligação de um anticorpo. Três alças de cada domínio, as regiões de determinação de complementaridade, formam uma superfície essencialmente contínua, que pode variar enormemente na sua forma, carga e outras características, possibilitando a ligação de determinados anticorpos a moléculas que variam desde pequenas moléculas a grandes superfícies proteicas.

34.3 A diversidade é gerada por rearranjos gênicos

A enorme diversidade das sequências de aminoácidos dos anticorpos é gerada por rearranjos de segmentos de genes. Para as cadeias leves κ dos anticorpos, 1 entre 40 regiões variáveis liga-se a 1 entre 5 regiões de junção. A unidade VJ combinada é então ligada à região constante. Milhares de genes diferentes podem ser gerados dessa maneira. Conjuntos semelhantes sofrem rearranjo para formar os genes das cadeias pesadas, porém uma região adicional, denominada

região de diversidade, situa-se entre as regiões V e J. A combinação de cadeias L e H, cada uma obtida por meio desses genes rearranjados, pode produzir mais de 10^8 anticorpos distintos. São também produzidas classes diferentes de anticorpos por rearranjos gênicos, levando à mudança de classe. A oligomerização de moléculas de anticorpo ligadas à membrana inicia uma cascata de transdução de sinais dentro das células B. As etapas essenciais nesse processo de sinalização incluem a fosforilação de resíduos de tirosina específicos em sequências denominadas motivos de ativação de imunorreceptor com base em tirosina, que estão presentes nas proteínas que se associam aos anticorpos ligados à membrana.

34.4 As proteínas do complexo principal de histocompatibilidade apresentam antígenos peptídicos na superfície celular para reconhecimento pelos receptores de células T

Os patógenos intracelulares, como os vírus e as micobactérias, não podem ser facilmente detectados. Proteínas intracelulares estão sendo constantemente clivadas em pequenos peptídios por proteassomos e apresentadas em proteínas do complexo principal de histocompatibilidade da classe I nas superfícies celulares. Esses peptídios estão localizados em um sulco definido por duas hélices nas proteínas do MHC da classe I. A combinação da proteína MHC e o peptídio pode ser ligada por um receptor apropriado de células T. Os receptores de células T assemelham-se, quanto à sua estrutura, aos domínios de ligação do antígeno dos anticorpos, e a diversidade de sua sequência é gerada por rearranjos gênicos V(D)J. O receptor de células T reconhece características tanto do peptídio quanto da molécula MHC que o apresenta. As células T citotóxicas iniciam o processo de apoptose nas células às quais se ligam por meio de interações entre receptores de células T e complexos de peptídio-MHC da classe I, auxiliadas por interações com a molécula correceptora CD8. As células T auxiliares reconhecem os peptídios apresentados nas proteínas do MHC da classe II, um tipo distinto de proteína MHC expressa apenas nas células apresentadoras de antígeno, como as células B e os macrófagos. As células T auxiliares expressam o correceptor CD4, em lugar de CD8. A molécula CD4 interage com proteínas MHC da classe II presentes nas células apresentadoras de antígenos. As vias de sinalização, que são análogas àquelas das células B, são iniciadas por interações entre complexos MHC-peptídio e receptores de células T e os correceptores CD8 e CD4. O vírus da imunodeficiência humana causa lesão do sistema imune ao infectar células que expressam CD4, como as células T auxiliares.

34.5 O sistema imunológico contribui para a prevenção e o desenvolvimento de doenças humanas

Em princípio, o sistema imunológico é capaz de produzir anticorpos e receptores de células T que se ligam a moléculas próprias – isto é, moléculas que normalmente estão presentes em um indivíduo saudável e não infectado. Os mecanismos de seleção impedem que essas moléculas autodirigidas sejam expressas em altos níveis. O processo de seleção inclui tanto a seleção positiva, para enriquecer a população de células que expressam moléculas com potencial de ligar-se a antígenos exógenos em um contexto apropriado, quanto a seleção negativa, que elimina as células que expressam moléculas com afinidade muito alta por autoantígenos. As doenças autoimunes, como o diabetes melito insulinodependente, podem resultar da amplificação de uma resposta contra um autoantígeno. As vacinas estimulam a memória

imunológica de modo a impedir a doença e até mesmo erradicá-la.

Palavras-chave

alça hipervariável (p. 992)
antígeno (p. 987)
antígeno carcinoembrionário (CEA) (p. 1009)
antígeno leucocitário humano (HLA) (p. 1000)
β_2-microglobulina (p. 1000)
cadeia leve (L) (p. 989)
cadeia pesada (H) (p. 989)
CD4 (p. 1005)
CD8 (p. 1002)
célula T (p. 999)
célula T auxiliar (p. 1004)
ciclosporina (p. 998)
complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (p. 1000)
determinante antigênico (epítopo) (p. 988)
doença autoimune (p. 1009)
endotoxina (p. 987)
enovelamento de imunoglobulina (domínio de imunoglobulina) (p. 992)
F_{ab} (p. 989)
fagócito (p. 986)
F_c (p. 989)
flexibilidade segmentar (p. 990)
granzima (p. 1004)
hapteno (p. 998)
imunoglobulina A (IgA) (p. 991)
imunoglobulina D (IgD) (p. 991)
imunoglobulina E (IgE) (p. 991)
imunoglobulina G (IgG) (p. 989)
imunoglobulina M (IgM) (p. 990)
linfócito B (célula B) (p. 987)
linfócito T auxiliar (p. 988)
linfócito T citotóxico (célula T *killer*) (p. 988)
memória imunológica (p. 1010)
motivo de ativação de imunorreceptor com base em tirosina (ITAM) (p. 997)
mudança de classe (p. 999)
padrão molecular associado a patógeno (PAMP) (p. 986)
perforina (p. 1004)
proteína do MHC da classe I (p. 1000)
proteína MHC da classe II (p. 1004)
proteína TAP (transportador associado ao processamento de antígeno) (p. 1000)
receptor de células T (p. 1002)
receptor semelhante a Toll (TLR) (p. 986)
recombinação V(D)J (p. 996)

região constante (p. 992)
região de determinantes de complementaridade (CDR) (p. 992)
região variável (p. 991)
resposta imune celular (p. 988)
resposta imune humoral (p. 987)
seleção negativa (p. 1008)
seleção positiva (p. 1008)
sistema imune adaptativo (p. 985)
sistema imune inato (p. 985)
vacina (p. 1010)
vacinas de toxoides (p. 1010)
vacinas mortas ou inativadas (p. 1010)
vacinas subunitárias (p. 1010)
vacinas vivas atenuadas (p. 1010)
vírus da imunodeficiência humana (HIV) (p. 1007)

Questões

1. *Primeiro, o mais importante*. Faça a distinção entre o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo.

2. *Diversidade dos anticorpos*. Quais os mecanismos empregados pelas células B para gerar a diversidade dos anticorpos?

3. *Fique firme*. Explique a diferença entre *afinidade* e *avidez*. Para que classe de imunoglobulina a avidez poderia ser particularmente importante no reconhecimento de antígenos?

4. *Habilidades inatas*. Foi identificada uma linhagem de camundongos que não responde ao LPS. Essa ausência de resposta deve-se à troca de um único aminoácido no domínio intracelular do TLR-4 murino. Proponha uma explicação para a ausência de resposta.

5. *Ligantes de TLR*. O PAMP reconhecido pelo TLR-3 é o RNA de fita dupla (RNAds, *do inglês double stranded*). Contra quais patógenos o TLR-3 seria um receptor imune efetivo?

6. *Energética e cinética*. Suponha que a constante de dissociação de um complexo F_{ab}-hapteno seja de 3×10^{-7} M a 25°C.

(a) Qual a energia livre padrão de ligação?

(b) Os imunologistas frequentemente falam de afinidade (K_a), a recíproca da constante de dissociação, ao comparar anticorpos. Qual a afinidade desse F_{ab}?

(c) A constante de velocidade para a liberação do hapteno do complexo é de 120 s^{-1}. Qual a constante de velocidade da associação? O que a magnitude desse valor significa em relação à extensão da mudança estrutural do anticorpo ao ligar-se ao hapteno?

7. *Um emissor brilhante*. Alguns derivados do naftaleno, como o grupo dansila, exibem uma fraca fluorescência amarela quando estão em um ambiente altamente polar (como a água) e intensa fluorescência azul quando se encontram em um ambiente acentuadamente apolar (como o hexano). A

ligação de ε-dansil-lisina a um anticorpo específico é acompanhada de acentuado aumento na sua intensidade de fluorescência e mudança de cor, do amarelo para o azul. O que esse achado revela acerca do complexo hapteno-anticorpo?

8. *Minianticorpo*. O fragmento F_{ab} de uma molécula de anticorpo tem essencialmente a mesma afinidade por um hapteno monovalente do que a IgG intacta.

(a) Qual a menor unidade de um anticorpo passível de conservar a especificidade e a afinidade de ligação da proteína integral?

(b) Projete uma proteína compacta de cadeia simples que seja provavelmente capaz de se ligar especificamente a um antígeno com alta afinidade.

9. *Ativando as células B*. A proliferação dos linfócitos B, que são os precursores dos plasmócitos, é desencadeada pela ligação de antígenos multivalentes a receptores em suas superfícies. Os receptores de superfície celular são imunoglobulinas transmembranares. Em contrapartida, os antígenos univalentes não ativam as células B.

(a) O que esses achados revelam sobre o mecanismo de ativação das células B?

(b) Como poderiam os anticorpos ser usados para ativar as células B?

10. *Uma engenhosa estratégia de clonagem*. Na clonagem do gene para a cadeia α do receptor de células T, os cDNA da célula T foram hibridizados com mRNA das células B. Qual foi o propósito dessa etapa de hibridização? Esse princípio pode ser aplicado em geral?

11. *Suscetibilidade a patógenos*. Os pacientes que apresentam mutações específicas no gene que codifica a proteína TLR-4 são suscetíveis a infecções por bactérias gram-negativas. Por que esses pacientes são vulneráveis a esse tipo particular de patógeno?

12. *Casamenteiro*. Por que é importante tipar os alelos HLA entre doador e receptor no transplante de órgãos?

13. *Instrução*. Antes do estabelecimento do mecanismo envolvido na produção da diversidade de anticorpos, foi proposto, principalmente por Linus Pauling, um mecanismo com base no enovelamento da proteína ao redor de um antígeno. Nesse modelo, os anticorpos que tinham especificidades diferentes apresentavam a mesma sequência de aminoácidos, porém eram enovelados de diferentes modos. Proponha um teste para esse modelo.

14. *Lidando com a falta de sentido*. As células, incluindo as células imunes, degradam moléculas de mRNA nas quais não está mais presente uma longa fase de leitura aberta. O processo é denominado degradação do RNA mediada por falta de sentido. Sugira um papel para esse processo nas células imunes.

15. *Sob controle, porém não exterminado*. Para compreender os genes responsáveis pelo crescimento e infectividade em uma linhagem bacteriana causadora de doença, você produz uma mutagênese química em uma cultura dessas bactérias. Durante a sua pesquisa sobre as propriedades dos mutantes assim produzidos, você identifica um conjunto de bactérias mutantes que ainda estão viáveis, mas cuja virulência está significativamente reduzida. Como esses mutantes poderiam ser úteis para o desenvolvimento de uma vacina?

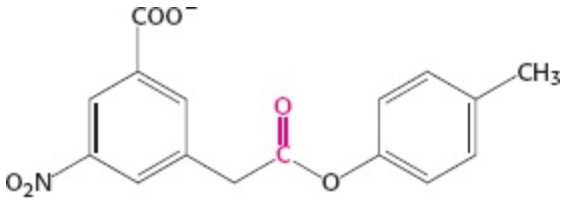
16. *Apresentação*. A sequência de aminoácidos de uma pequena proteína é:

MSRLASKNLIRSDHAGGLLQATYSAVSSIKNTMSFGAWSNAALNDSRDA

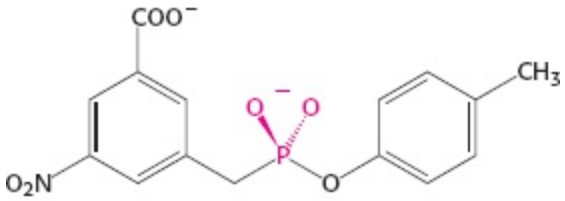
Preveja o peptídio mais provável a ser apresentado pela molécula MHC da classe I, HLA-A2.

Questão sobre mecanismo

17. *Anticorpo catalítico*. Um anticorpo é produzido contra um estado de transição para a hidrólise do seguinte éster.



Éster



Análogo do estado de transição

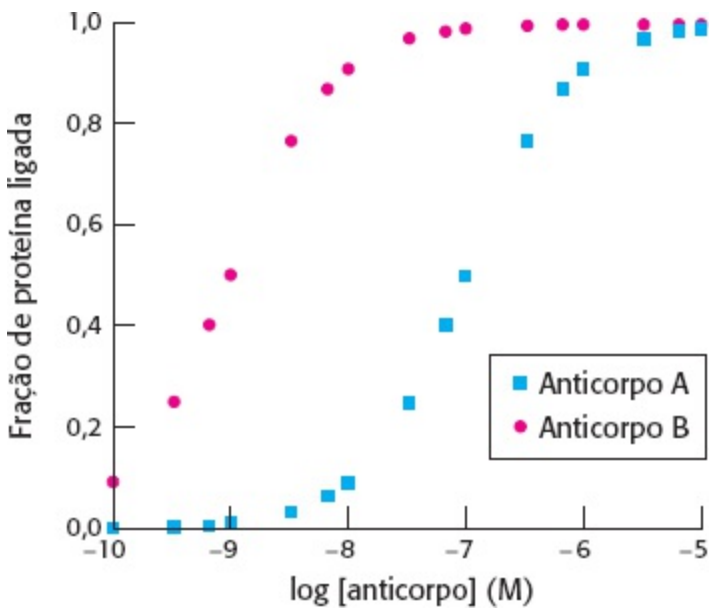
Alguns desses anticorpos catalisam a hidrólise do éster. Que resíduo de aminoácido você poderia esperar encontrar no sítio de ligação do anticorpo?

Questão | Integração de capítulos

18. *Sinalização*. As proteínas tirosina fosfatases, como a molécula CD45 expressa nas células tanto B quanto T, desempenham papéis importantes na ativação de proteínas tirosina quinases, como Fyn e Lck, que são muito semelhantes a Src. Sugira um mecanismo para a ativação dessas proteína quinases pela remoção de um grupo fosforila de um resíduo de fosfotirosina.

Questão | Interpretação de dados

19. *Maturação de afinidade*. Um camundongo é imunizado com uma proteína humana oligomérica. Pouco depois da imunização, obtém-se uma linhagem celular que expressa um único tipo de molécula de anticorpo (anticorpo A). A capacidade do anticorpo A de ligar-se à proteína humana é avaliada, e os resultados obtidos são mostrados no gráfico abaixo.

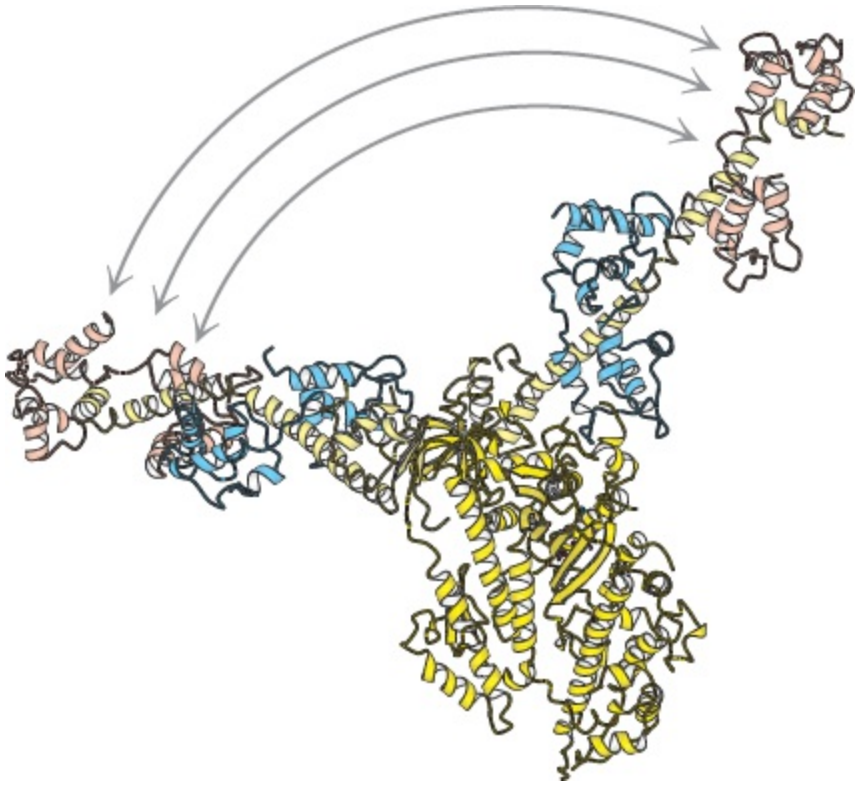


Depois de repetidas imunizações com a mesma proteína, obtém-se outra linhagem celular que expressa um anticorpo diferente (anticorpo B). Os resultados da análise de ligação do anticorpo B à proteína também são mostrados. A partir desses dados, calcule

(a) a constante de dissociação (K_d) para o complexo entre a proteína e o anticorpo A.

(b) a constante de dissociação para o complexo entre a proteína e o anticorpo B.

A comparação das sequências de aminoácidos dos anticorpos A e B revela que elas são idênticas, exceto por um único aminoácido. O que esse achado sugere sobre o mecanismo pelo qual foi gerado o gene que codifica o anticorpo B?



Os poderosos músculos do cavalo, como os músculos de todos os animais, são acionados pela proteína motora molecular, a miosina. Uma parte da miosina move-se extraordinariamente (conforme ilustrado acima) em resposta à ligação do ATP, hidrólise e liberação do produto, propelindo a miosina ao longo do filamento de actina. Esse movimento molecular é traduzido em movimento de todo o animal, vividamente ilustrado pelo cavalo empinando de da Vinci. [Imagem à esquerda, estudo de um cavalo empinando de Leonardo da Vinci para a *Batalha de Anghiari* (c.1504) da The Royal Collection © Her Royal Majesty Queen Elizabeth II.]

SUMÁRIO

35.1 As proteínas motoras moleculares são, em sua maioria, membros da superfamília de NTPase com alça P

35.2 As moléculas de miosina movem-se ao longo de filamentos de actina

35.3 A cinesina e a dineína movem-se ao longo de microtúbulos

35.4 Um motor giratório impulsiona o movimento bacteriano

Os organismos, dos seres humanos até as bactérias, movem-se para se adaptar a mudanças ambientais, deslocando-se em direção ao alimento e fugindo do perigo. As próprias células não são estáticas, e sim conjuntos fervilhantes de proteínas, ácidos nucleicos e organelas em movimento. Esse movimento é proporcionado por dois elementos: as proteínas motoras moleculares e redes complexas de proteínas filamentosas, denominadas *citoesqueleto* (Figura 35.1). As redes dinâmicas que determinam o formato e a mobilidade das células estão entre as áreas mais ativas de pesquisa na biologia celular moderna. De modo notável, os mecanismos bioquímicos fundamentais que produzem contrações em nossos músculos são os mesmos que propulsionam as organelas ao longo do citoesqueleto. Com efeito, muitas das proteínas que desempenham papéis essenciais na conversão da energia química em energia cinética são membros da mesma família de proteínas, as NTPases com alça P, o grupo extremamente importante de proteínas discutidas pela primeira vez no Capítulo 9. Esses motores moleculares são homólogos às proteínas que já encontramos em outros contextos, incluindo as proteínas G na síntese de proteínas, sinalização e outros processos. Mais uma vez, testemunhamos a economia da evolução no processo de adaptar proteínas já existentes para desempenhar novas funções.

Os motores moleculares operam por pequenos incrementos, transformando mudanças na conformação de proteínas em movimento direcionado. O movimento ordenado ao longo de distâncias exige uma trilha para orientar o movimento do aparelho motor. Na verdade, já tivemos a oportunidade de analisar uma classe de motores moleculares que utiliza mecanismos que iremos discutir aqui – as helicases que se movem ao longo do DNA durante a sua replicação (Seção 28.1). As proteínas descritas neste capítulo movem-se ao longo da actina e de microtúbulos – filamentos proteicos compostos de subunidades repetitivas. As proteínas motoras ciclam entre formas que exibem alta ou baixa afinidade pelos trilhos de filamentos em resposta à ligação e hidrólise do ATP, possibilitando um mecanismo de ligação, tração e liberação que gera movimento.

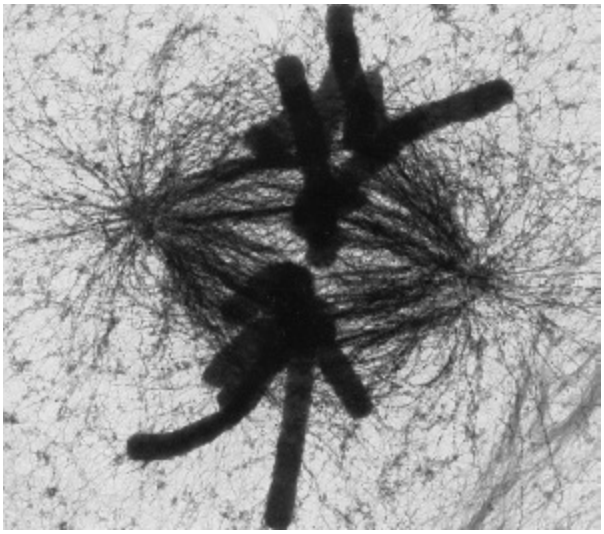


Figura 35.1 Movimento no interior de células. Essa micrografia eletrônica de alta voltagem mostra o aparelho mitótico em uma célula de mamífero em metáfase. Os grandes objetos cilíndricos são cromossomos, enquanto as estruturas filiformes que se estendem através do centro são microtúbulos, componentes essenciais do esqueleto. Os microtúbulos servem como trilhos para os motores moleculares que movimentam os cromossomos. Muitos processos, incluindo a segregação dos cromossomos na mitose, dependem da ação de proteínas motoras moleculares. [Cortesia do Dr. J. R. McIntosh.]

Consideraremos também uma estratégia totalmente diferente para gerar movimento, aquela usada por bactérias, como *E. coli*. Nesses microrganismos, um conjunto de flagelos atua como hélices, que giram impulsionadas por um motor existente na membrana da célula bacteriana. Esse movimento giratório é impulsionado por um gradiente de prótons através da membrana, em lugar da hidrólise do ATP. O mecanismo para o acoplamento do gradiente de prótons ao movimento rotatório é análogo àquele utilizado pela subunidade F_0 da ATP sintase. Por conseguinte, ambos os modos principais de armazenamento da energia bioquímica – isto é, ATP e gradientes de íons – foram aproveitados pela evolução para acionar movimentos moleculares organizados.

35.1 As proteínas motoras moleculares são, em sua maioria, membros da superfamília de NTPase com alça P

As células eucarióticas contêm três famílias principais de proteínas motoras: as miosinas, as cinesinas e as dineínas. Os membros de cada uma dessas classes movem-se ao longo de componentes do citoesqueleto; todavia, à primeira vista, essas famílias de proteínas parecem ser muito diferentes uma das outras. A *miosina*, inicialmente caracterizada com base no seu papel no músculo, movimenta-se ao longo de filamentos da proteína actina. Cada molécula de miosina muscular consiste em duas cópias de uma *cadeia pesada* com massa molecular de 220 kDa, uma *cadeia leve essencial* e uma *cadeia leve regulatória*. O genoma humano codifica mais de 40 miosinas distintas; algumas delas atuam na contração muscular, enquanto outras participam de uma variedade de outros processos. As *cinesinas*, que desempenham um papel no transporte de proteínas, mRNA e vesículas, bem como na construção do fuso mitótico e na segregação dos cromossomos, são, em geral, dímeros de dois polipeptídios. O genoma humano codifica mais de 40 cinesinas. As *dineínas* acionam o movimento dos cílios e dos flagelos, e uma dineína citoplasmática geral contribui para uma variedade de movimentos em todas as células, incluindo transporte de vesículas e vários eventos de

transporte na mitose. As dineínas são moléculas enormes, com cadeias pesadas de massa molecular acima de 500 kDa. O genoma humano codifica aproximadamente 10 dineínas.

Inicialmente, a comparação das sequências de aminoácidos das miosinas, cinesinas e dineínas não revelou qualquer relação significativa entre essas famílias de proteínas; entretanto, após a determinação de suas estruturas tridimensionais, foi constatado que os membros das famílias das miosinas e cinesinas apresentam semelhanças notáveis. Em particular, tanto a miosina quanto a cinesina contêm cernes de NTPase com alças P homólogos aos encontrados nas proteínas G. A análise de sequência da cadeia pesada da dineína revela que se trata de um membro da subfamília AAA de NTPases com alça P, que já encontramos no contexto do proteassomo 19 S (Seção 23.2). A dineína tem seis sequências que codificam esses domínios de NTPase com alça P dispostos ao longo de seu comprimento, embora apenas quatro, na realidade, pareçam se ligar a nucleotídios. Por conseguinte, podemos esperar a existência de semelhanças nos mecanismos de ação, e podemos aproveitar nossos conhecimentos sobre as NTPases com alça P em geral quando formos analisar os mecanismos de ação dessas proteínas motoras.

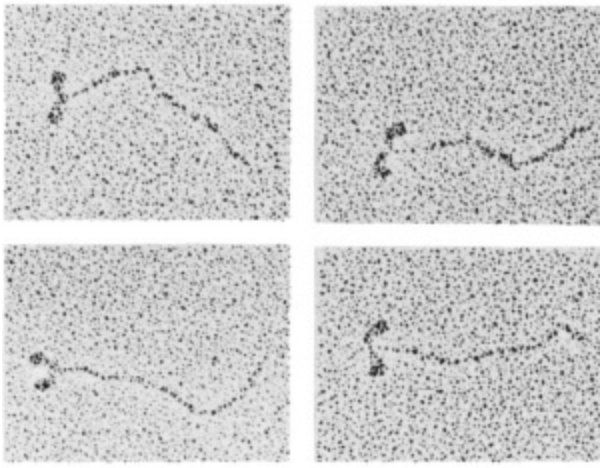


Figura 35.2 Estrutura da miosina em baixa resolução. As micrografias eletrônicas de moléculas de miosina revelam uma estrutura com duas cabeças e uma cauda longa e fina. [Cortesia de Dra. Paula Flicker, Dr. Theo Walliman e Dr. Peter Vibert.]

Os motores moleculares são, em geral, proteínas oligoméricas com um cerne de ATPase e uma estrutura distendida

Consideremos em primeiro lugar a estrutura da miosina, que foi examinada de maneira sucinta no Capítulo 9. Os resultados de estudos de microscopia eletrônica da miosina do músculo esquelético mostram que se trata de uma estrutura com duas cabeças ligada a uma longa haste (Figura 35.2). O tratamento da miosina com tripsina e papaína resulta na formação de quatro segmentos: dois segmentos S1; uma meromiosina pesada (HMM, *do inglês heavy meromyosin*), que consiste nos fragmentos S1 e em uma região adicional, denominada S2; e um fragmento denominado meromiosina leve (LMM, *do inglês light meromyosin*, Figura 34.3). Cada *fragmento S1 c*orresponde a uma das cabeças da estrutura intacta e inclui 850 aminoácidos aminoterminais de uma das duas cadeias pesadas, bem como uma cópia de cada uma das cadeias leves. O exame da estrutura de um fragmento S1 em alta resolução revela a presença do cerne com domínio de NTPase com alça P, que é o sítio de ligação e hidrólise do ATP (Figura 35.4). A estrutura e o mecanismo de ação desse domínio motor foram examinados no Capítulo 9.

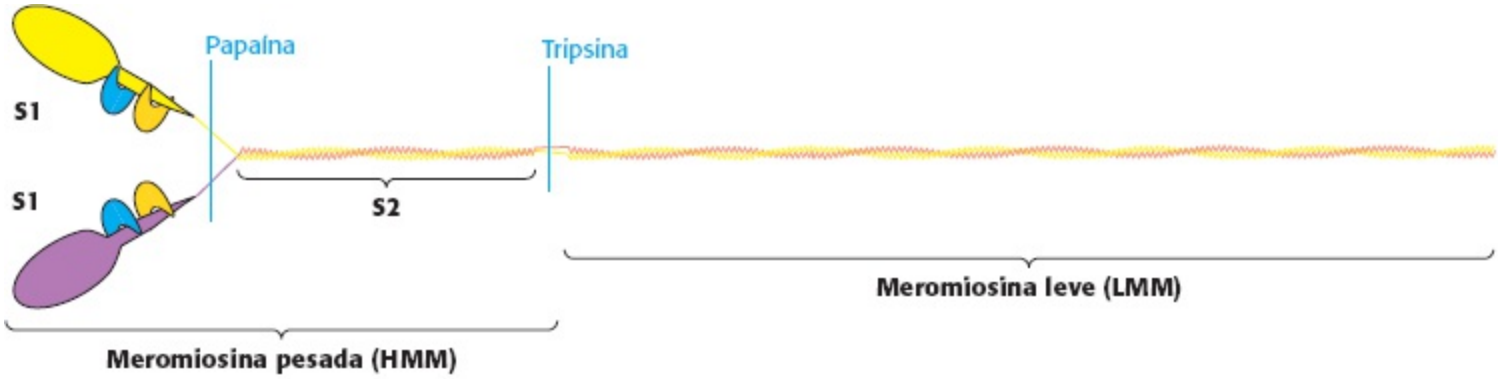


Figura 35.3 Dissecção da miosina. O tratamento da miosina muscular com proteases forma fragmentos estáveis, incluindo os subfragmentos S1 e S2 e a meromiosina leve. Cada fragmento S1 inclui uma cabeça (em amarelo ou violeta) da cadeia pesada e uma cópia de cada cadeia leve (em azul e laranja).

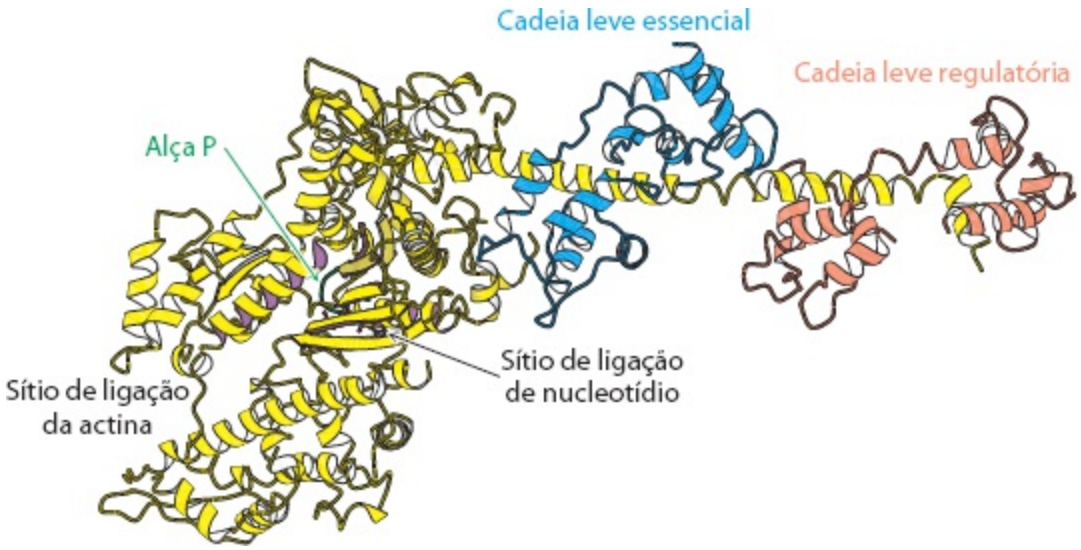


Figura 35.4 Estrutura da miosina em alta resolução. A estrutura do fragmento S1 da miosina muscular revela a presença de um domínio de NTPase com alça P (em violeta). *Observe* que uma α-hélice, que se estende a partir desse domínio, constitui o sítio de ligação para as duas cadeias leves. [Desenhada a partir de 1DFL.pdb.]

A partir dessa estrutura, uma longa α-hélice estende-se da cadeia pesada. Essa hélice constitui o sítio de ligação para as duas cadeias leves. As cadeias leves são membros da família com mão EF (*EF hand)*, semelhantes à calmodulina (ver Figura 14.16), embora a maioria das mãos EF nas cadeias leves não se ligue a íons metálicos (Figura 35.5). À semelhança da calmodulina, essas proteínas enrolam-se ao redor de uma α-hélice, servindo para espessá-la e enrijecê-la. Os fragmentos remanescentes da miosina – S2 e meromiosina leve – são, em grande parte, em α-hélice, formando super-hélices de duas fitas, criadas pelos comprimentos remanescentes das duas cadeias pesadas que se enrolam uma ao redor da outra (Figura 35.6). Essas estruturas, que juntas se estendem por aproximadamente 1.700 Å, ligam as cabeças da miosina a outras estruturas. Na miosina muscular, vários domínios LMM unem-se para formar feixes de ordem maior.

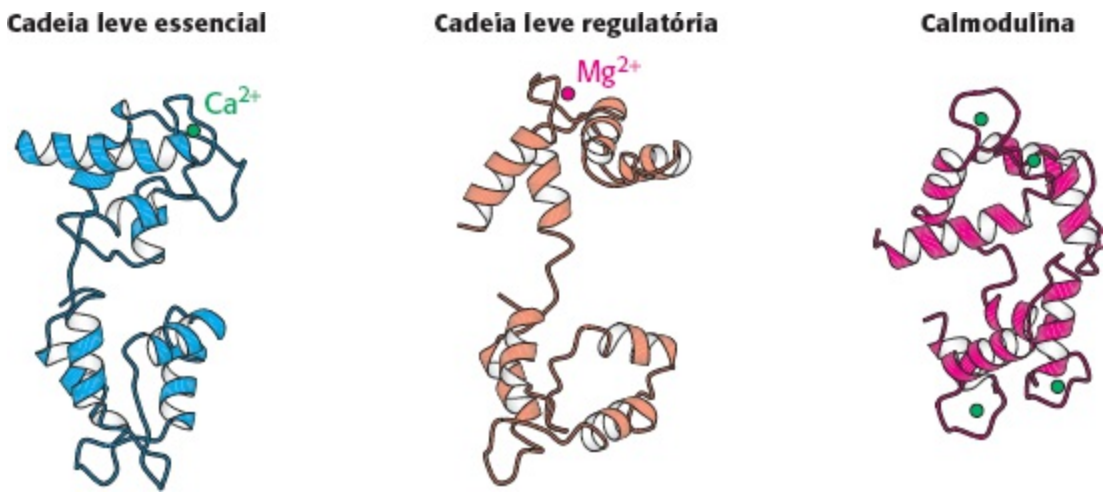


Figura 35.5 Cadeias leves de miosina. As estruturas das cadeias leves essencial e regulatória da miosina muscular são comparadas com a estrutura da calmodulina. *Observe* as semelhanças dessas estruturas, que possibilitam a ligação de cada uma dessas proteínas homólogas a uma α-hélice (não ilustrada) enrolando-se ao seu redor. [Desenhada a partir de 1DFL.pdb e 1CM1.pdb.]

Figura 35.6 Super-hélice de duas fitas da miosina. As duas α-hélices formam estruturas superespiraladas com giro de mão esquerda, que se enrolam uma ao redor da outra. Essas estruturas são estabilizadas por resíduos hidrofóbicos nos pontos de contato entre as duas hélices. [Desenhada a partir de 2TMA.pdb.]

A *cinesina convencional* (cinesina 1), a primeira cinesina descoberta, apresenta várias características estruturais em comum com a miosina. A proteína dimérica tem duas cabeças conectadas por uma estrutura distendida (Figura 35.7). O tamanho do domínio da cabeça corresponde a aproximadamente um terço daquele da miosina. A determinação da estrutura tridimensional de um fragmento de cinesina revelou que o domínio da cabeça também é construído ao redor de um cerne de

NTPase com alça P (Figura 35.8). O domínio de miosina é muito maior que o da cinesina, devido a duas grandes inserções no domínio de miosina que se ligam aos filamentos de actina. Na cinesina convencional, uma região de aproximadamente 500 aminoácidos estende-se a partir do domínio da cabeça. À semelhança da região correspondente na miosina, a parte distendida da cinesina forma uma super-hélice. A cinesina convencional também apresenta cadeias leves; todavia, diferentemente daquelas da miosina, essas cadeias leves ligam-se perto da extremidade carboxiterminal da cadeia pesada, e acredita-se que liguem o motor à carga intracelular.

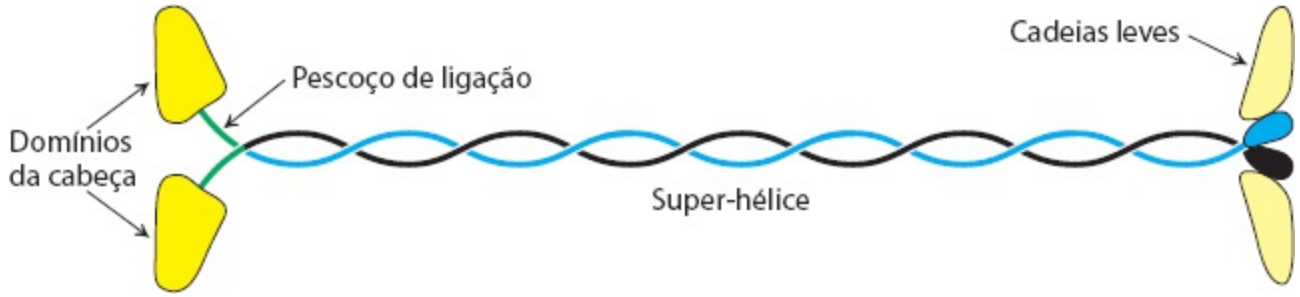


Figura 35.7 Estrutura da cinesina. A estrutura alongada tem os domínios da cabeça em uma das extremidades e os domínios de ligação de carga na outra, ligados por uma longa região de super-hélice.

A dineína apresenta uma estrutura um tanto diferente. Conforme assinalado anteriormente, a cadeia pesada de dineína inclui seis regiões que são homólogas à subfamília AAA de domínios de ATPase. Embora ainda não se disponha de dados cristalográficos, os resultados dos estudos de microscopia eletrônica e comparação com estruturas conhecidas de outras ATPases AAA formaram a base para a construção de um modelo da estrutura da dineína (Figura 35.9). O domínio da cabeça está ligado a uma região de aproximadamente 1.300 aminoácidos, que forma uma estrutura distendida que reúne unidades de dineína para formar oligômeros e que interage com outras proteínas.

Figura 35.8 Estrutura do domínio da cabeça da cinesina em alta resolução. *Observe* que o domínio da cabeça da cinesina tem a estrutura de um cerne de NTPase com alça P (indicado pela coloração violeta). [Desenhada a partir de 1I6I.pdb.]

Embora as estruturas dessas três classes de motores moleculares exibam diferenças significativas, são observadas algumas características em comum. Cada estrutura é dimérica com dois domínios de cabeça, apresenta regiões de estruturas distendidas, porém bem rígidas, e regiões para interação com outras proteínas. Como veremos adiante, essas estruturas são apropriadas para ações que se assemelham a subir por uma corda, com as mãos. As regiões de interação com outras proteínas representam as mãos que seguram a corda, as estruturas distendidas representam os braços que atuam como alavanca para promover uma movimentação em maior escala, e os domínios da cabeça são os motores que fornecem a energia mecânica necessária.

A ligação e a hidrólise do ATP induzem mudanças na conformação e na afinidade de ligação das proteínas motoras

No Capítulo 9, examinamos as mudanças conformacionais que ocorrem no domínio de ATPase da miosina do mixomiceto *Dictyostelium*. As estruturas dos domínios de ATP da miosina de outras fontes também foram elucidadas em uma variedade de formas. O fragmento S1 da miosina do músculo da vieira, um tipo de molusco, fornece um exemplo notável das mudanças observadas (Figura 35.10). A estrutura desse fragmento S1 foi determinada em diversas formas, incluindo uma forma sem nucleotídio ligado e uma forma ligada a um complexo formado por ADP e vanadato (VO_4^{3-}) que, conforme mencionado no Capítulo 9, é um análogo do estado de transição de hidrólise do ATP. A longa hélice que liga as cadeias leves (designadas como *braço de alavanca*) projeta-se para fora do domínio da cabeça. A comparação das estruturas revela que o braço de alavanca sofreu uma rotação de quase 90° no complexo ADP-VO_4^{3-} em comparação com sua posição na forma livre de nucleotídio. Como a espécie no sítio de ligação de nucleotídio causa essa notável transição? Duas regiões ao redor do sítio de ligação de nucleotídio (denominadas *acionador I* e *acionador II, switch I e II*) adaptam-se estritamente ao formato do grupo γ-fosforila do análogo de ATP e adotam uma conformação mais flexível quando o grupo γ-fosforila está ausente (Figura 35.11). Essa mudança conformacional possibilita o ajuste de uma α-hélice longa (denominada *hélice relé, relay*) à sua posição. A extremidade carboxiterminal da hélice relé interage com estruturas na base do braço de alavanca, de modo que a ocorrência de mudança na posição da hélice relé leva a uma reorientação do braço de alavanca.

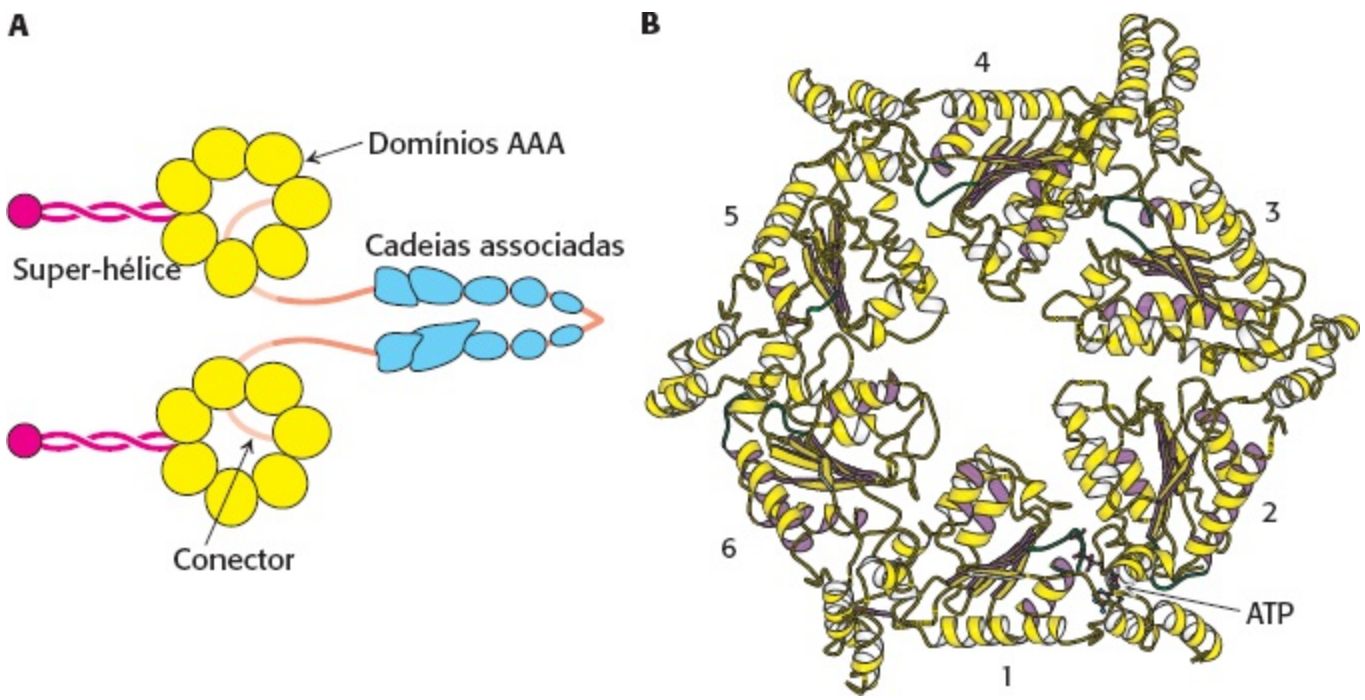


Figura 35.9 Estrutura da dineína. A. Estrutura global da dineína. **B**. Modelo do domínio motor da dineína. *Observe* os seis domínios de NTPase com alça P, alguns dos quais se ligam ao ATP e o hidrolisam. [Desenhada a partir de 1HN5.pdb.]

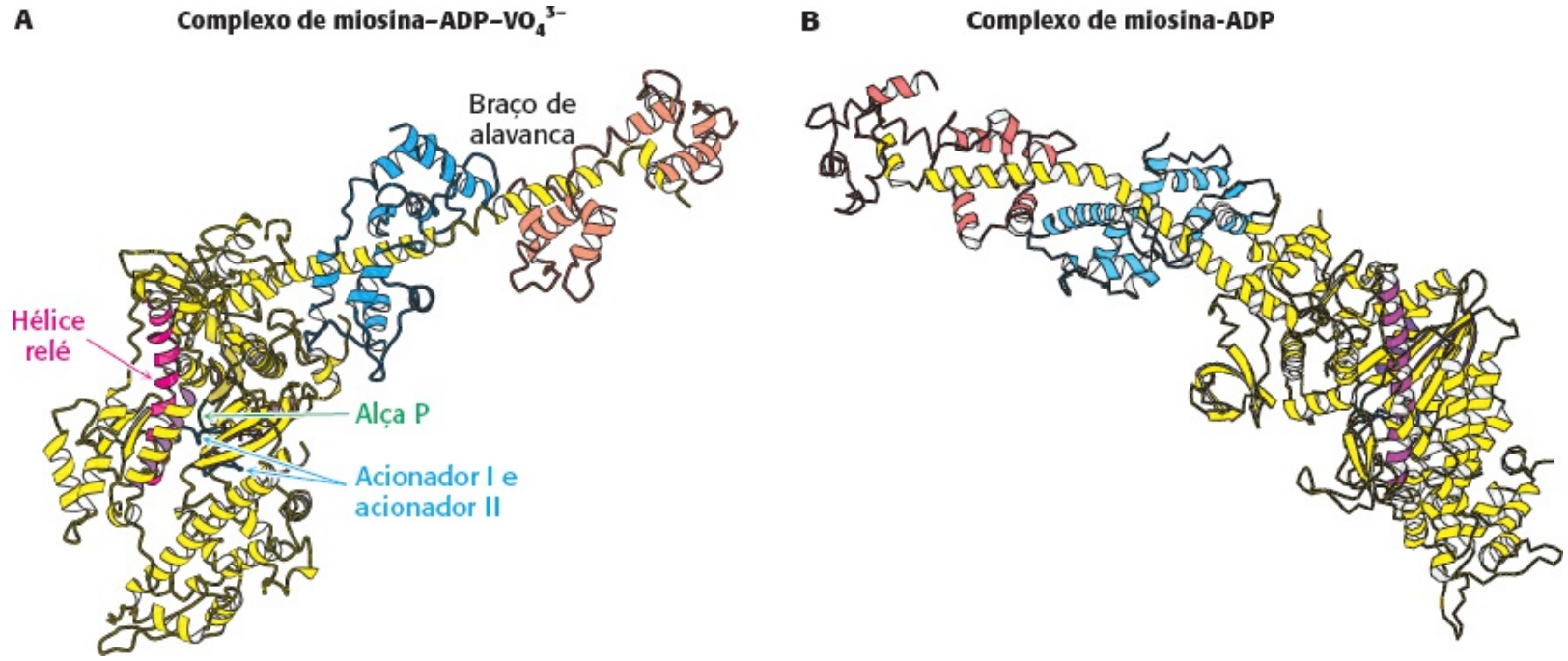


Figura 35.10 Movimento do braço de alavanca. Duas formas do fragmento S1 da miosina do músculo de vieira, um tipo de molusco. *Observe* as mudanças drásticas de conformação quando a identidade do nucleotídio ligado muda do complexo ADP-VO_4^{3-} para a forma livre de nucleotídio, ou vice-versa, incluindo uma reorientação de quase 90° no braço de alavanca. [Desenhada a partir de 1DFL.pdb e 1SR6.pdb.]

Ocorrem mudanças conformacionais análogas na cinesina. As cinesinas também apresentam uma alça relé que pode adotar diferentes configurações quando a cinesina se liga a nucleotídios diferentes. Entretanto, a cinesina carece de uma α-hélice braço de alavanca. Em seu lugar, um segmento relativamente curto, denominado *pescoço conector*, muda de conformação em resposta à ligação de nucleotídio (Figura 35.12). O pescoço conector liga-se ao domínio da cabeça da cinesina quando o ATP está ligado, porém é liberado quando o sítio de ligação do nucleotídio está desocupado ou ocupado pelo ADP.

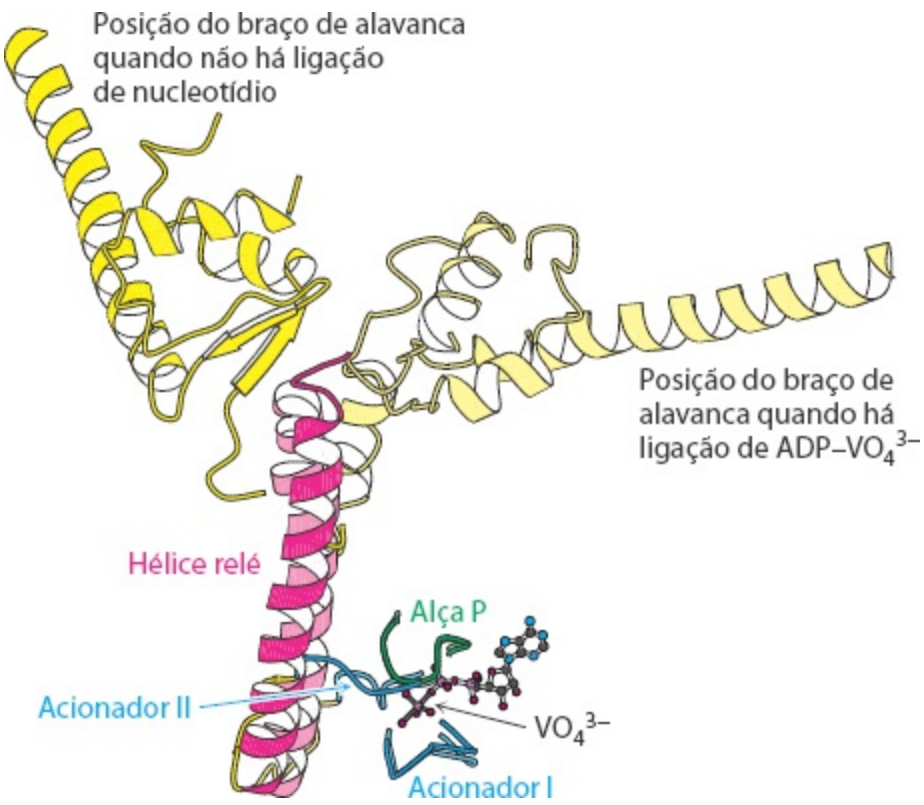


Figura 35.11 Hélice relé. Uma superposição de elementos essenciais em duas formas da miosina do molusco vieira revela as mudanças estruturais que são transmitidas pela hélice relé das alças de acionador I e acionador II para a base do braço de alavanca. *Observe* que as alças de ambos os acionadores interagem com VO_4^{3-} na posição que seria ocupada pelo grupo γ-fosforila do ATP. A estrutura do complexo miosina-ADP-VO_4^{3-} é mostrada em cores mais claras. [Desenhada a partir de 1DFL.pdb e 1SR6.pdb.]

35.2 As moléculas de miosina movem-se ao longo de filamentos de actina

As moléculas de miosina, cinesina e dineína movem-se ciclando entre estados com afinidades diferentes pelas macromoléculas poliméricas longas que atuam como trilhos ao longo dos quais se movimentam. No caso da miosina, o trilho molecular é uma forma polimérica de *actina*, uma proteína de 42 kDa, que é uma das proteínas mais abundantes das células eucarióticas, correspondendo, tipicamente, a até 10% da proteína total. Iniciaremos com uma discussão geral da estrutura polimérica da actina e a sua montagem. Em seguida, examinaremos as interações entre a miosina e a actina, incluindo tanto a estrutura quanto as interações dinâmicas entre essas duas proteínas. Por fim, discutiremos a estrutura do músculo e os papéis da miosina e da actina na contração muscular.

A actina é um polímero polar, dinâmico e de automontagem

A estrutura do monômero de actina foi determinada em resolução atômica por cristalografia de raios X e tem sido usada para interpretar a estrutura dos filamentos de actina, que já era um pouco conhecida pelos estudos de microscopia eletrônica de menor resolução. Cada monômero de actina é constituído de quatro domínios (Figura 35.13). Esses domínios se unem para circundar um nucleotídio ligado, ATP ou ADP. A forma com ATP pode ser convertida na forma com ADP por hidrólise.

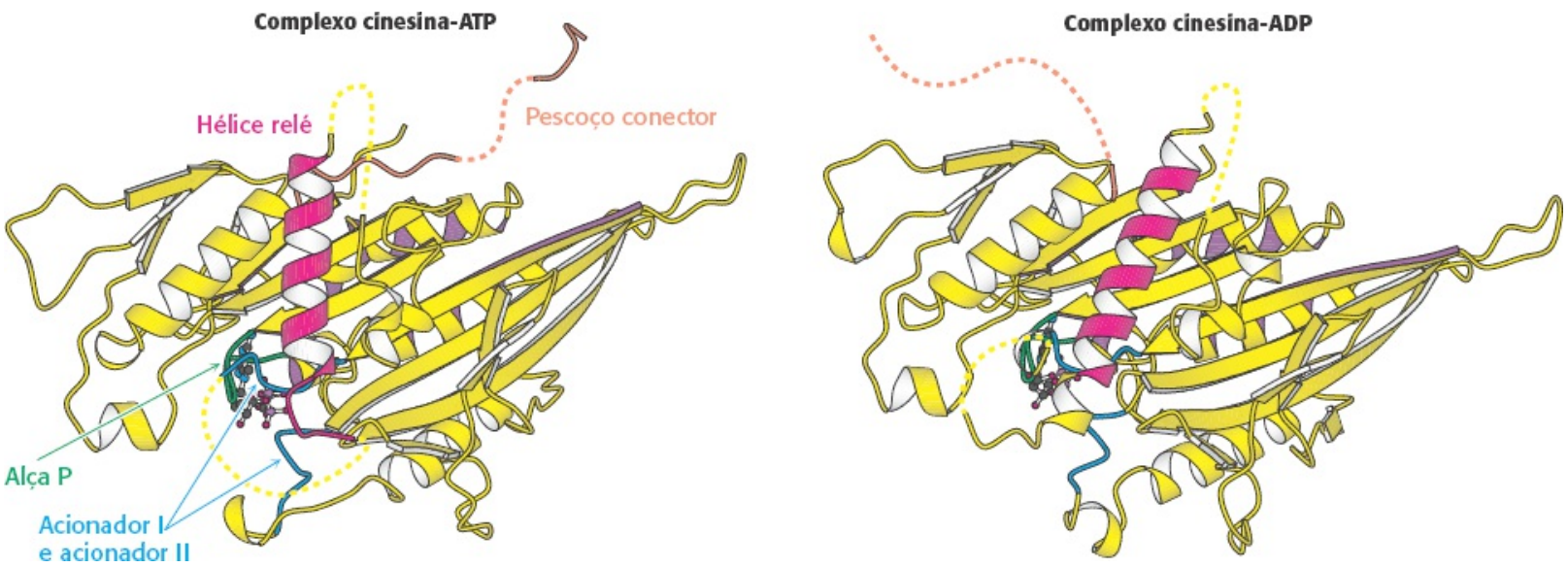


Figura 35.12 Pescoço conector (*neck linker*). Comparação das estruturas de uma cinesina ligada ao ADP e a um análogo de ATP. *Observe* que o pescoço conector (em laranja), que conecta o domínio da cabeça ao restante da molécula de cinesina, está ligado ao domínio da cabeça na presença do análogo de ATP, porém está livre na presença apenas de ADP. [Desenhada a partir de 1l6l.pdb e 1l5S.pdb.]

Os monômeros de actina (frequentemente denominados *actina-G*, de globular) unem-se para formar filamentos de actina (frequentemente denominados *actina-F;* ver Figura 35.13). A actina-F tem uma estrutura helicoidal; cada monômero está relacionado com o precedente por uma translação de 27,5 Å e uma rotação de 166° ao redor do eixo da hélice. Como a rotação é de quase 180°, a actina-F assemelha-se a um cabo de dois fios. Observe que cada monômero de actina está orientado no mesmo sentido ao longo do filamento de actina-F, de modo que a estrutura é polar, com extremidades diferentes discerníveis. Uma extremidade é denominada extremidade farpada (mais), enquanto a outra é a extremidade pontuda (menos). Os termos "farpada" e "pontuda" referem-se à aparência de um filamento de actina quando os fragmentos S1 de miosina estão ligados a ele.

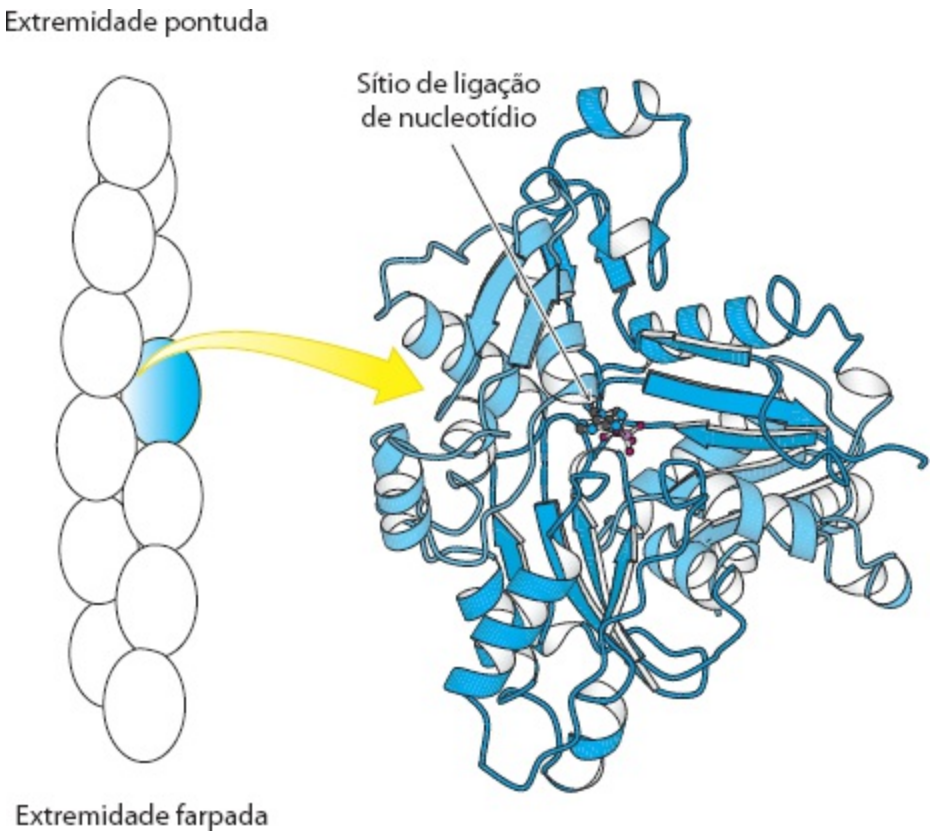
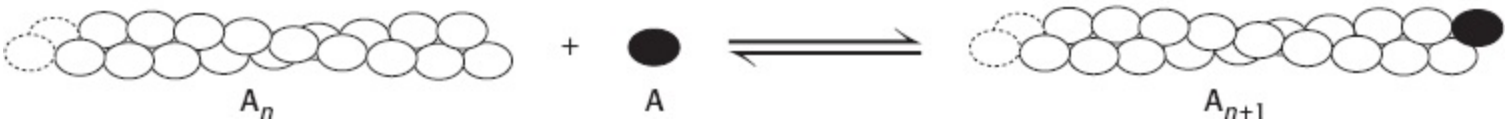


Figura 35.13 Estrutura da actina. À esquerda, visão esquemática dos monômeros de actina (um em azul) de um filamento de actina. À direita, os domínios na estrutura com quatro domínios de um monômero de actina são identificados por diferentes tonalidades de azul. *Observe* o sítio de ligação de nucleotídio no centro da estrutura. [Desenhada a partir de 1J6Z.pdb.]

Como são formados os filamentos de actina? À semelhança de muitas estruturas biológicas, os filamentos de actina sofrem automontagem, isto é, em condições apropriadas, os monômeros de actina se unem, formando filamentos polares bem estruturados. A agregação dos dois ou três primeiros monômeros para formar um filamento é muito desfavorável. Por conseguinte, complexos proteicos especializados, incluindo um complexo denominado Arp2/3, atuam como núcleos para a montagem de actina nas células. Uma vez formado esse núcleo de filamento, a adição de subunidades torna-se mais favorável. Consideremos a reação de polimerização com mais detalhes. Chamaremos de A_n um filamento de actina com n subunidades. Esse filamento pode ligar-se a um monômero adicional de actina, A, para formar A_{n+1}.

$$K_d = \frac{[A_n][A]}{[A_{n+1}]}$$



A constante de dissociação K_d para essa reação define as concentrações de monômeros nas quais irá ocorrer a reação de polimerização, visto que a concentração de polímeros de comprimento $n + 1$ será essencialmente igual à de polímeros de comprimento n. Assim,

$$[A_n] \sim [A_{n+1}] \qquad \text{e} \qquad K_d = \frac{[A_n][A]}{[A_{n+1}]} \sim [A]$$

Em outras palavras, a reação de polimerização irá prosseguir até que a concentração de monômeros seja reduzido ao valor de K_d. Se a concentração de monômeros estiver abaixo do valor de K_d, não haverá reação de polimerização; com efeito, os filamentos existentes irão se despolimerizar até que a concentração de monômeros alcance o valor da K_d. Devido a esses fenômenos, a K_d é designada como *concentração crítica* para o polímero. Convém lembrar que a actina contém um sítio de ligação de nucleotídio que pode conter o ATP ou ADP. A concentração crítica para o complexo de actina-ATP é aproximadamente 20 vezes mais baixa que aquela para o complexo de actina-ADP. O complexo actina-ATP polimeriza-se mais prontamente do que o de actina-ADP.

Os filamentos de actina dentro das células são estruturas altamente dinâmicas, que estão continuamente ganhando e perdendo monômeros. A nucleação por complexos como Arp2/3 pode iniciar a polimerização da actina-ATP. Em contrapartida, a hidrólise do ATP ligado a ADP favorece a *d*espolimerização da actina. Essa reação atua como cronômetro para tornar os filamentos de actina cineticamente instáveis. As proteínas que se ligam aos monômeros de actina ou que promovem a separação dos filamentos de actina também desempenham papéis. As reações de polimerização podem exercer força, pressão ou tração sobre as membranas celulares. *A polimerização regulada da actina é fundamental para as mudanças de formato da célula associadas à motilidade celular nas amebas bem como em células humanas, como os macrófagos*.

Os domínios da cabeça de miosina ligam-se aos filamentos de actina

Não foi possível ainda estabelecer a estrutura *in vivo* de um complexo entre a actina e a miosina em uma resolução alta o suficiente para identificar detalhes moleculares. Entretanto, o tratamento de filamentos de actina com fragmentos S1 de miosina na ausência de ATP resulta em um complexo denominado *actina decorada*, cuja estrutura foi determinada por microscopia crioeletrônica, em uma resolução de 13 Å. Embora uma estrutura nessa resolução apenas não seja adequada para observar detalhes moleculares, a superposição das estruturas de alta resolução dos monômeros de actina e do fragmento S1 da miosina sobre a estrutura da actina decorada pode constituir uma fonte de entendimento nos detalhes de sua estrutura (Figura 35.14). O domínio da cabeça da miosina encontra-se em uma conformação próxima daquela observada para a forma sem nucleotídio. Essa estrutura também revela as superfícies de interação entre a miosina e a actina. O modelo sugere que a conformação dos domínios da cabeça da miosina modifica-se ligeiramente para aumentar a sua interação com o filamento de actina. Essas mudanças conformacionais resultam em uma ligeira abertura do sítio de ligação de nucleotídio na miosina. Essa observação tem implicações no mecanismo pelo qual a miosina se movimenta ao longo dos filamentos de actina.

Os movimentos de proteínas motoras isoladas podem ser observados diretamente

Uma vez descritas as mudanças de conformação subjacentes à ação da miosina, podemos observar como a miosina "caminha" ao longo de seu trilho de actina. Os estudos de *moléculas isoladas de miosina*, movendo-se em relação a filamentos de actina, têm nos ajudado a compreender os detalhes dos mecanismos subjacentes à contração muscular e outros processos complexos. Um poderoso instrumento para esses estudos, denominado *captura óptica*, depende de feixes de *laser* altamente focalizados (Figura 35.15). Pequenas esferas podem ser capturadas e mantidas no lugar em solução.

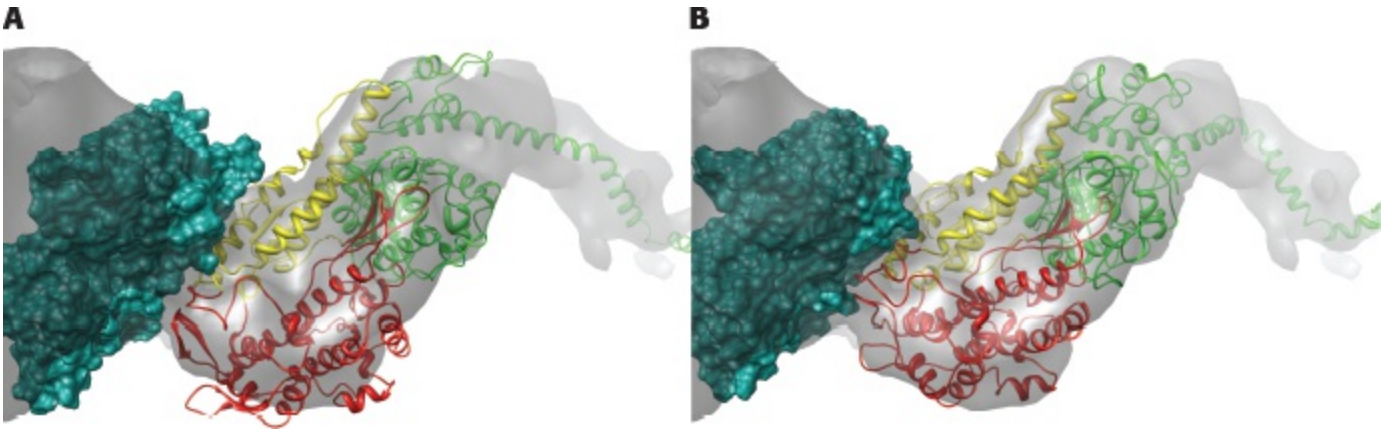


Figura 35.14 Estrutura da miosina ligada à actina. A. A superfície cinza representa a estrutura observada por microscopia crioeletrônica, enquanto o modelo de preenchimento espacial verde representa uma subunidade de actina. O diagrama em fita mostra a estrutura do fragmento S1 da miosina inserido na estrutura de microscopia crioeletrônica. *Observe* que parte da estrutura da miosina situa-se fora da superfície cinza. **B**. A estrutura após o ajuste da estrutura do fragmento S1 da miosina corresponde mais estreitamente àquela observada na microscopia crioeletrônica. *Observe* que a estrutura de miosina corresponde, agora, mais estreitamente à superfície cinza. [M. Lorenz and K. C. Holmes. *PNAS* 107:12529-12534, 2010. Copyright 2010 National Academy of Sciences, U.S.A.]

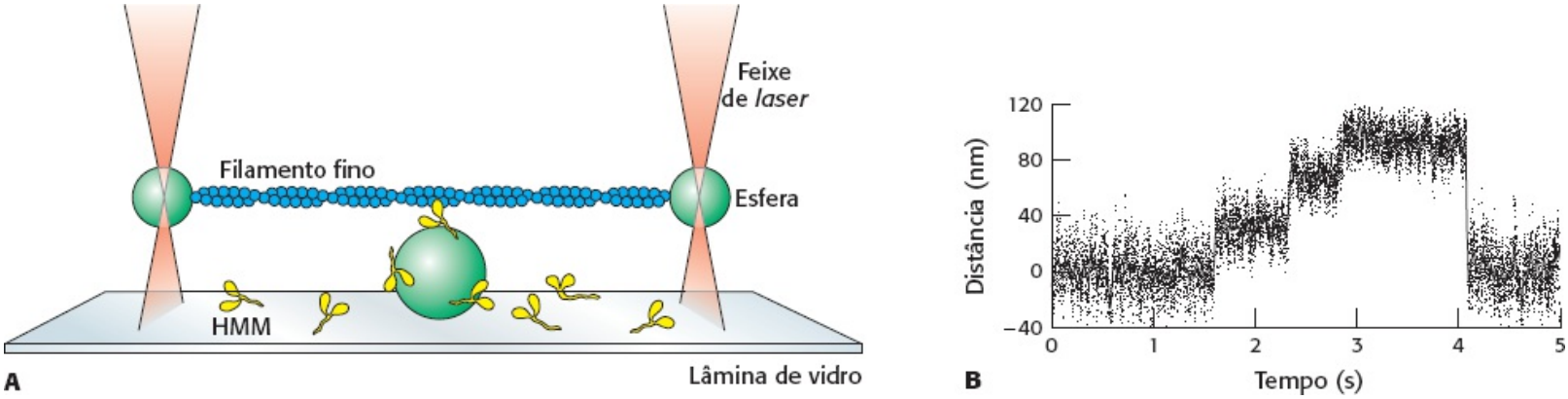


Figura 35.15 Observação de uma proteína motora isolada em ação. A. Um filamento de actina (em azul) é colocado em cima de um fragmento de meromiosina pesada (HMM) (em amarelo), que se projeta de uma esfera em uma lâmina de vidro. Uma esfera fixada a cada extremidade do filamento de actina é mantida em captura óptica produzida por um intenso feixe de *laser* infravermelho focalizado (em laranja). A posição dessas esferas pode ser medida com precisão da ordem de nanômetros. **B**. Registro do deslocamento de um filamento de actina devido a um derivado de miosina fixado a uma esfera, influenciado pela adição de ATP. Observe as distâncias das etapas bastante uniformes que são observadas. [(A) De J. T. Finer, R. M. Simmons, and J. A. Spudich. *Nature* 368:113-119, 1994. (B) De R. S. Rock, M. Rief, A. D. Metra, and J. A. Spudich. *Methods* 22:378-381, 2000.]

A posição das esferas pode ser monitorada com precisão da ordem de nanômetros. James Spudich e colaboradores criaram um arranjo experimental consistindo em um filamento de actina com uma esfera fixada em cada extremidade. Cada esfera podia ser capturada em um dispositivo de captura óptica (uma em cada extremidade do filamento), e o filamento de actina podia ser tracionado sobre uma lâmina de microscópio contendo outras esferas que tinham sido revestidas com fragmentos de miosina, como o fragmento de meromiosina pesada (ver Figura 35.15). Com a adição de ATP, foram observados deslocamentos transitórios do filamento de actina ao longo do seu eixo. A distância das etapas de deslocamento foi bastante uniforme, com tamanho médio de 11 nm (110 Å).

Os resultados desses estudos, realizados na presença de concentrações variáveis de ATP, mostram que as cabeças de miosina individuais ligam-se ao filamento de actina e sofrem uma mudança de conformação (movimento de força, *power stroke*) que traciona o filamento de actina, levando ao deslocamento das esferas. Após um certo tempo, a cabeça de miosina libera a actina, que então retorna ao lugar.

A liberação de fosfato desencadeia o movimento de força (*power stroke*) da miosina

Como a hidrólise do ATP aciona o movimento de força (*power stroke)*? Uma observação fundamental para essa resposta é que a adição de ATP a um complexo de miosina e actina resulta na dissociação do complexo. Por conseguinte, a ligação e a hidrólise do ATP não podem ser diretamente responsáveis pelo *movimento* de força (*power stroke*). Podemos combinar esse fato com as observações estruturais descritas anteriormente para elaborar um mecanismo para o movimento da miosina ao longo da actina (Figura 35.16). Comecemos com a miosina sem nucleotídio ligada à actina. A ligação de ATP à actina resulta em dissociação da miosina da actina. Ligado ao ATP e livre da actina, o domínio de miosina pode sofrer a mudança conformacional associada à formação do estado de transição para a hidrólise do ATP. Essa mudança de conformação resulta na reorientação do braço de alavanca. Nessa forma, a cabeça da miosina pode ligar-se ao filamento de actina; o fosfato é liberado, com movimentação concomitante do braço de alavanca. *Essa mudança de conformação representa o movimento de força (power stroke) e move o corpo da molécula de*

miosina em relação ao filamento de actina por uma distância de aproximadamente 110 Å. A liberação de ADP completa o ciclo.

O músculo é um complexo de miosina e actina

O mecanismo de movimento de uma única molécula de miosina em relação a um filamento de actina explica como os músculos se contraem. O músculo dos vertebrados que está sob controle voluntário, como o bíceps e o tríceps no braço, tem um aspecto em faixas (estriado) quando examinado ao microscópio óptico. O músculo estriado consiste em células multinucleadas que são delimitadas por uma membrana plasmática eletricamente excitável. Uma célula muscular contém numerosas *miofibrilas* paralelas, cada uma com cerca de 1 μm de diâmetro. A unidade funcional, denominada *sarcômero*, repete-se tipicamente a cada 2,3 μm (23.000 Å) ao longo do eixo da fibrila no músculo relaxado (Figura 35.17). Uma *banda A* escura e uma *banda I* clara alternam-se regularmente. A região central da banda A, denominada *zona H*, é menos densa do que o resto da banda. A banda I é dividida ao meio por uma *linha Z* estreita e muito densa.

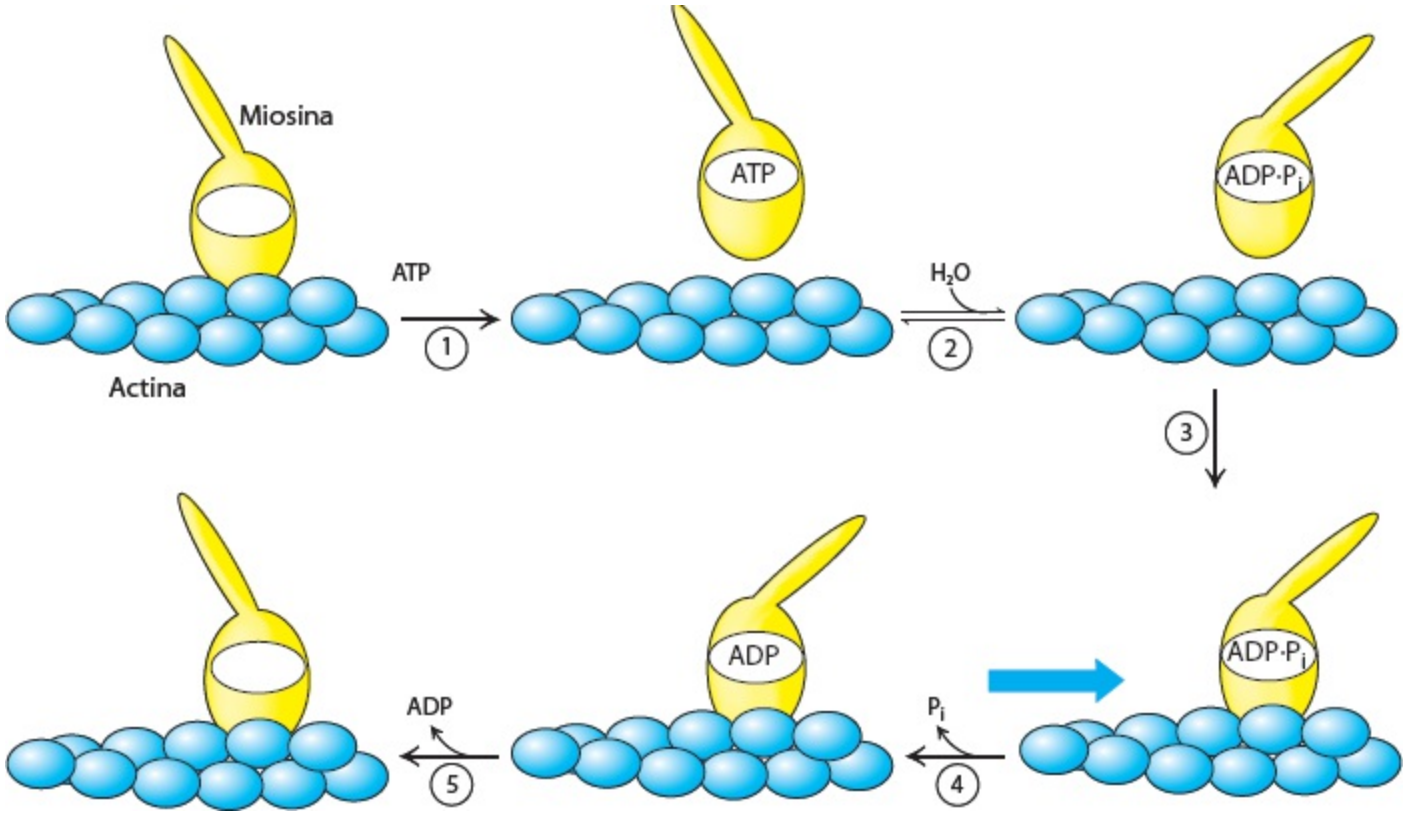


Figura 35.16 Movimento da miosina ao longo da actina. Uma cabeça de miosina (em amarelo) na forma apo está ligada a um filamento de actina (em azul). A ligação do ATP (**1**) resulta na liberação da miosina da actina. A hidrólise reversível do ATP ligado à miosina (**2**) pode resultar na reorientação do braço de alavanca. Com o ATP hidrolisado, porém ainda ligado à actina, a miosina pode ligar-se à actina (**3**). A liberação de P (**4**) resulta em reorientação do braço de alavanca e na movimentação concomitante da actina em relação à miosina. A liberação de ADP (**5**) completa o ciclo.

O plano molecular subjacente de um sarcômero é revelado por cortes transversais de uma miofibrila. Esses cortes transversais mostram a presença de dois tipos de filamentos proteicos que interagem. Os *filamentos espessos* apresentam diâmetros de cerca de 15 nm (150 Å) e são constituídos principalmente de miosina. Os *filamentos finos* têm diâmetros de aproximadamente 8 nm (80 Å) e consistem em actina, bem como em *tropomiosina* e *complexo de troponina*. A contração

muscular ocorre pelo deslizamento dos filamentos finos ao longo do comprimento dos filamentos espessos, um processo acionado pela hidrólise do ATP (Figura 35.18).

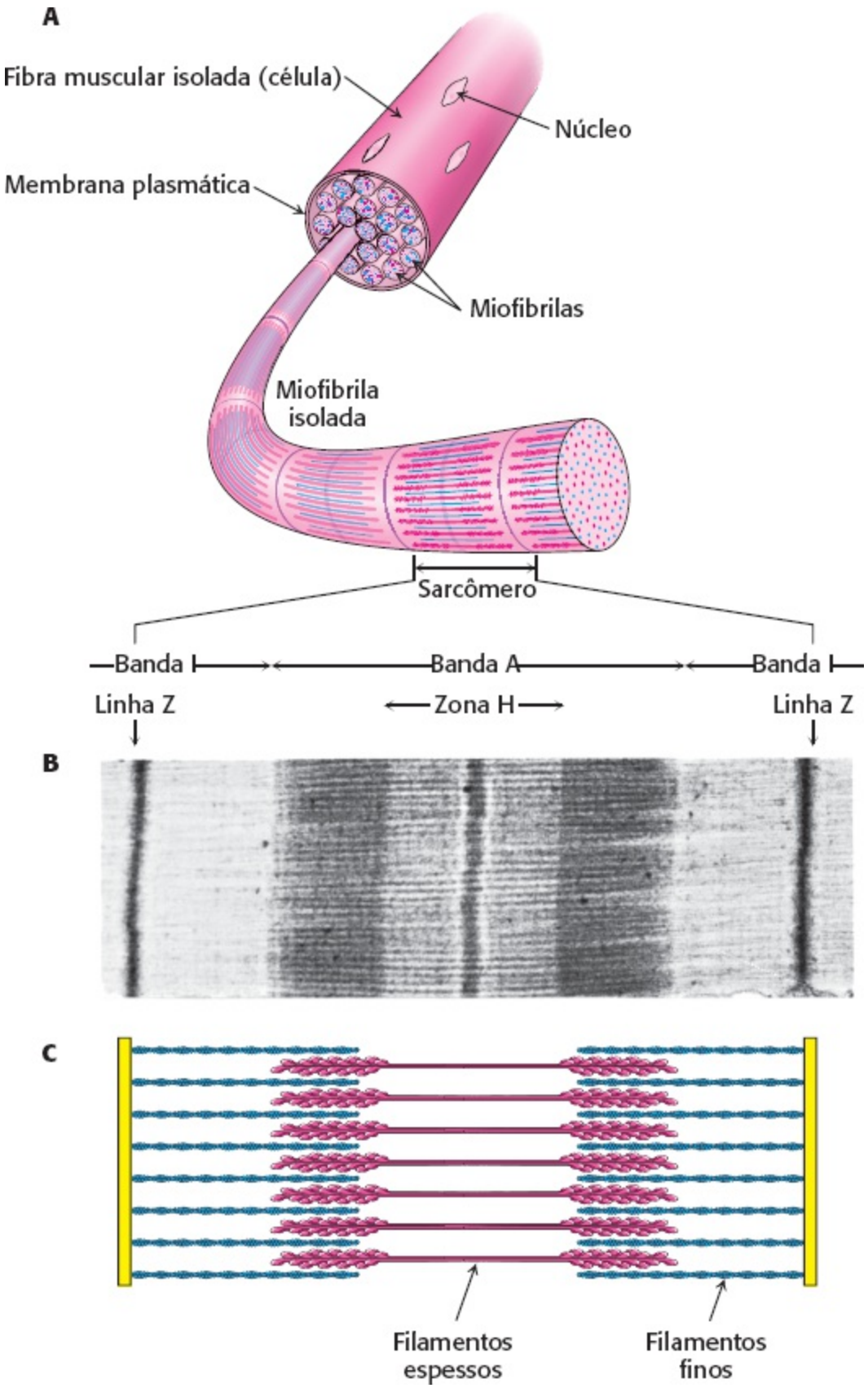


Figura 35.17 Sarcômero. A. A estrutura da célula muscular e da miofibrila contendo sarcômeros. **B**. Micrografia eletrônica de um corte longitudinal de uma miofibrila de músculo esquelético, mostrando um único sarcômero. **C**. Representação esquemática do sarcômero, correspondendo às regiões na micrografia. [(B) Cortesia do Dr. Hug Huxley.]

Para formar os filamentos espessos, as moléculas de miosina sofrem automontagem em estruturas

bipolares espessas, com as cabeças de miosina projetando-se em ambas as extremidades de uma região desnuda no centro (Figura 35.19A). Cerca de 500 domínios de cabeça revestem a superfície de cada filamento espesso. Cada região rica em cabeças associa-se a dois filamentos de actina, um em cada lado das moléculas de miosina (Figura 35.19B). A interação de cabeças de miosina individuais com unidades de actina cria a força de deslizamento que produz a contração muscular.

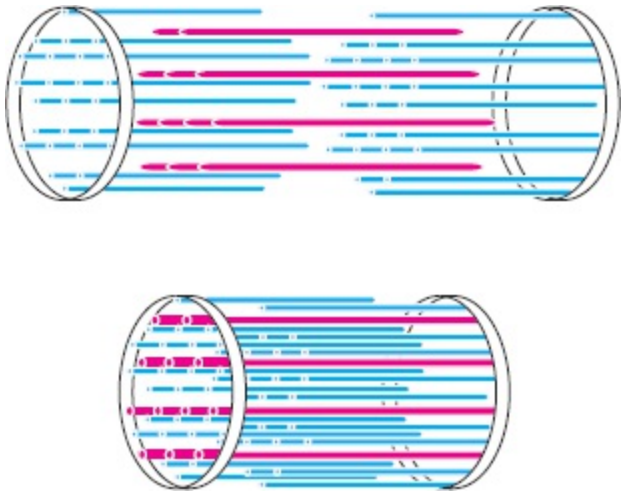


Figura 35.18 Modelo de filamentos deslizantes. A contração muscular depende do movimento de filamentos finos (em azul) em relação aos filamentos espessos (em vermelho). [De H. E. Huxley. The mechanism of muscular contraction. Copyright © 1965 by Scientific American, Inc. Todos os direitos reservados.]

A tropomiosina e o complexo de troponina regulam esse deslizamento em resposta a impulsos nervosos. Em condições de repouso, a tropomiosina bloqueia a interação íntima entre a miosina e a actina. Um impulso nervoso leva a um aumento da concentração de íons cálcio dentro da célula muscular. Um componente do complexo de troponina percebe o aumento de Ca^{2+} e, em resposta, alivia a inibição das interações miosina-actina pela tropomiosina.

Como o ciclo de reação da miosina aplica-se à contração muscular? Convém lembrar que centenas de domínios de cabeça projetam-se a partir das extremidades de cada filamento espesso. Esses domínios estão pareados nos dímeros de miosina, porém as duas cabeças dentro de cada dímero atuam de modo independente. Os filamentos de actina associam-se a cada região rica em cabeças, com as extremidades farpadas da actina em direção à linha Z. Na presença de níveis normais de ATP, a maioria das cabeças de miosina está separada da actina. Cada cabeça pode hidrolisar independentemente ATP, ligar-se à actina, liberar P_i e sofrer seu movimento de força (*power stroke*). Como poucas outras cabeças estão ligadas, o filamento de actina está relativamente livre para deslizar. Cada cabeça faz um ciclo aproximadamente cinco vezes por segundo, com um movimento de 110 Å por ciclo. Todavia, quando centenas de cabeças estão interagindo com o mesmo filamento de actina, a taxa global de movimento da miosina em relação ao filamento de actina pode alcançar 80.000 Å por segundo, possibilitando a rápida contração de um sarcômero totalmente relaxado para a sua forma totalmente contraída. Ter muitas cabeças de miosina que se ligam rapidamente e de modo independente a um filamento de actina, movendo-o, possibilita uma velocidade muito maior do que a que poderia ser alcançada por uma única proteína motora.

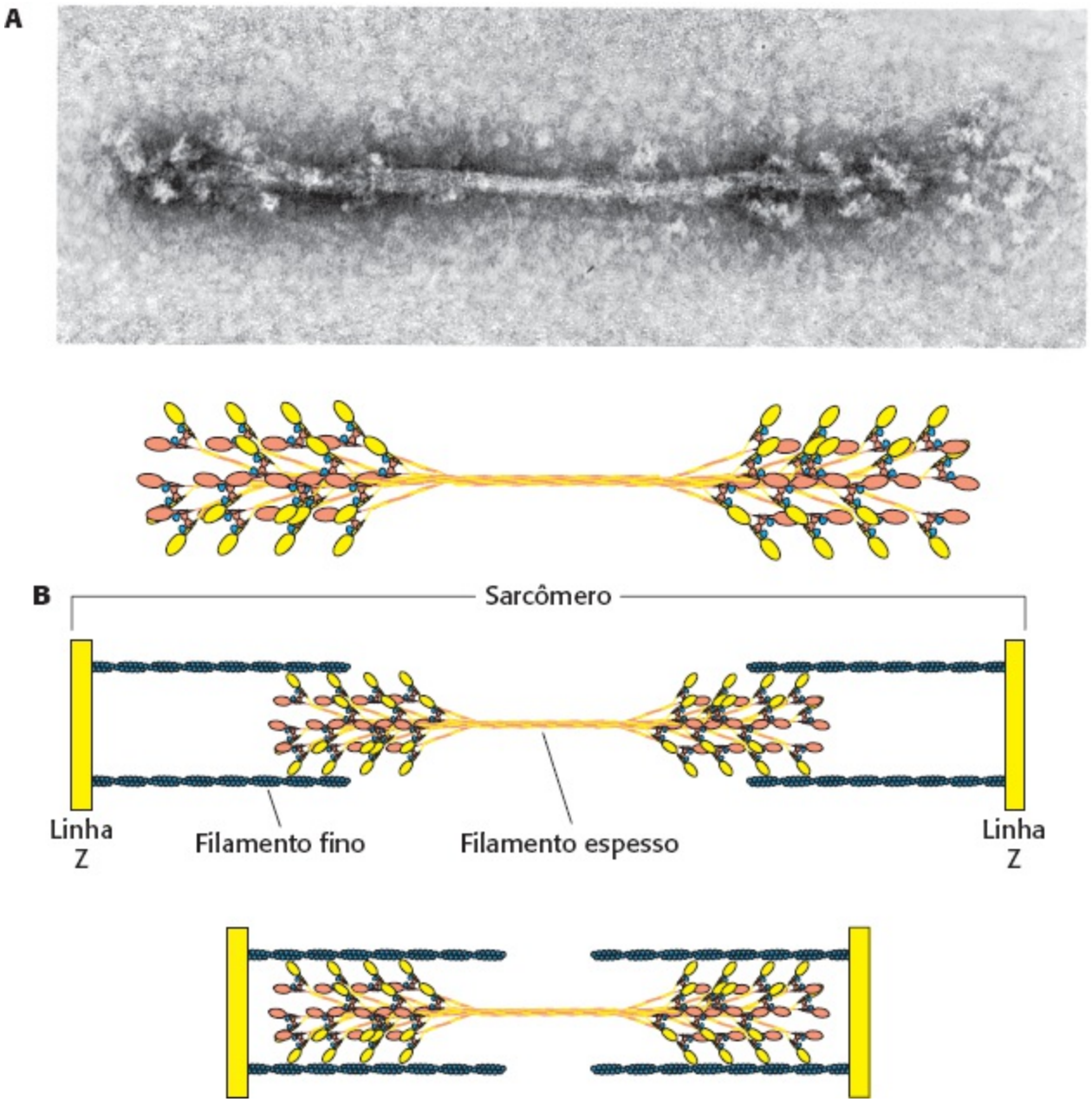


Figura 35.19 Filamento espesso. A. Uma micrografia eletrônica de um filamento espesso reconstituído revela a presença de domínios de cabeça de miosina em cada extremidade, com uma região central relativamente estreita. Uma vista esquemática abaixo mostra como as moléculas de miosina se juntam para formar o filamento espesso. **B**. Esquema mostrando a interação dos filamentos espessos e finos na contração do músculo esquelético. [(A, em cima) Cortesia do Dr. Hug Huxley.]

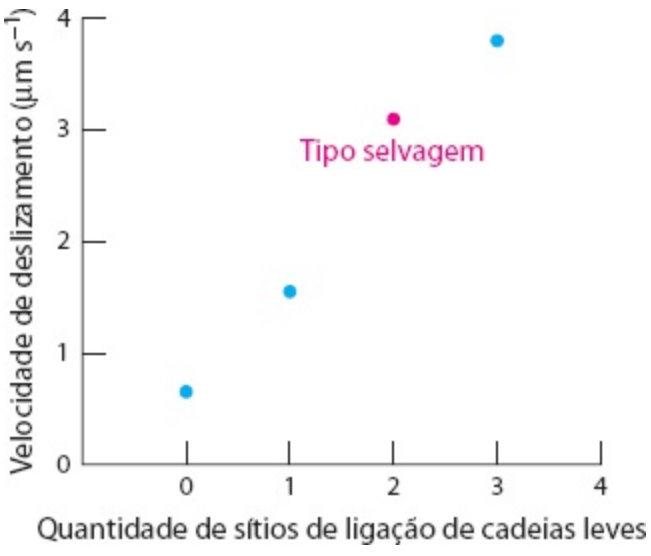


Figura 35.20 Comprimento do braço de alavanca da miosina. O exame das velocidades de movimento da actina obtidas por um conjunto de mutantes de miosina com diferentes quantidades de sítios de ligação de cadeias leves revelou uma relação linear. Quanto maior a quantidade de sítios de ligação de cadeias leves (e, portanto, quanto mais longo o braço de alavanca), maior a velocidade de deslizamento. [De T. Q. P. Uyeda, P. D. Abramson, and J. A. Spudich. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:4459-4464, 1996.]

O comprimento do braço de alavanca determina a velocidade motora

Uma característica fundamental dos motores de miosina consiste no papel do braço de alavanca como amplificador. O braço de alavanca amplifica pequenas mudanças estruturais no sítio de ligação de nucleotídio para alcançar o movimento de 110 Å ao longo do filamento de actina que ocorre em cada ciclo de hidrólise do ATP. Uma forte previsão sobre o mecanismo proposto para o movimento da miosina ao longo da actina é que a distância percorrida por ciclo deve depender do comprimento de seu braço de alavanca. Por conseguinte, o comprimento do braço de alavanca deve influenciar a velocidade global com que a actina se move em relação a um conjunto de cabeças de miosina.

Essa previsão foi testada com o uso de formas mutantes de miosina com braços de alavanca de diferentes comprimentos. O braço de alavanca na miosina muscular inclui sítios de ligação para duas cadeias leves (Seção 35.1). Por conseguinte, os pesquisadores encurtaram o braço de alavanca ao deletar as sequências que correspondem a um ou a ambos esses sítios de ligação. Em seguida, examinaram as velocidades com que os filamentos de actina eram transportados ao longo de coleções dessas miosinas mutantes (Figura 35.20). Conforme previsto, a velocidade diminuiu à medida que o braço de alavanca foi encurtado. Uma forma mutante de miosina com braço de alavanca acentuadamente longo foi gerada pela inserção de 23 aminoácidos correspondentes ao sítio de ligação para uma cadeia leve regulatória adicional. De modo notável, foi constatado que essa forma mantinha um movimento da actina que foi *mais rápido que o da proteína de tipo selvagem*. Esses resultados sustentam fortemente o papel proposto para o braço de alavanca na contribuição da atividade motora da miosina.

35.3 A cinesina e a dineína movem-se ao longo de microtúbulos

Além da actina, o citoesqueleto inclui outros componentes, notadamente filamentos intermediários e microtúbulos. Os microtúbulos atuam como trilhos para duas classes de proteínas motoras – as cinesinas e as dineínas. As cinesinas que se movem ao longo dos microtúbulos geralmente transportam cargas, como organelas e vesículas, do centro da célula para a sua periferia. As dineínas são importantes no deslizamento de microtúbulos uns em relação aos outros durante o batimento dos cílios e dos flagelos na superfície de algumas células eucarióticas. Além disso, as dineínas transportam cargas da periferia para o centro da célula.

Alguns membros da família das cinesinas são cruciais para o transporte de organelas e outras cargas para as terminações nervosas na periferia dos neurônios. Portanto, não é surpreendente que a ocorrência de mutações nessas cinesinas possa levar a distúrbios do sistema nervoso. Por exemplo, mutações em uma cinesina denominada KIF1β podem levar à mais comum das neuropatias periféricas (fraqueza e dor nas mãos e nos pés), a doença de Charcot-Marie-Tooth, que acomete 1 em 2.500 indivíduos. Em algumas pessoas acometidas, foi identificada uma mutação de glutamina para

leucina na alça P do domínio motor dessa cinesina. Foram produzidos camundongos nocaute com uma ruptura do gene ortólogo. Camundongos heterozigotos para o distúrbio apresentam sintomas semelhantes aos observados em seres humanos; os homozigotos morrem pouco depois do nascimento. Mutações em outros genes de cinesina foram associadas à paraplegia espática humana. Nesses distúrbios, defeitos no transporte ligado à cinesina podem comprometer diretamente a função nervosa, e a diminuição na atividade de neurônios específicos pode levar a outros processos degenerativos.

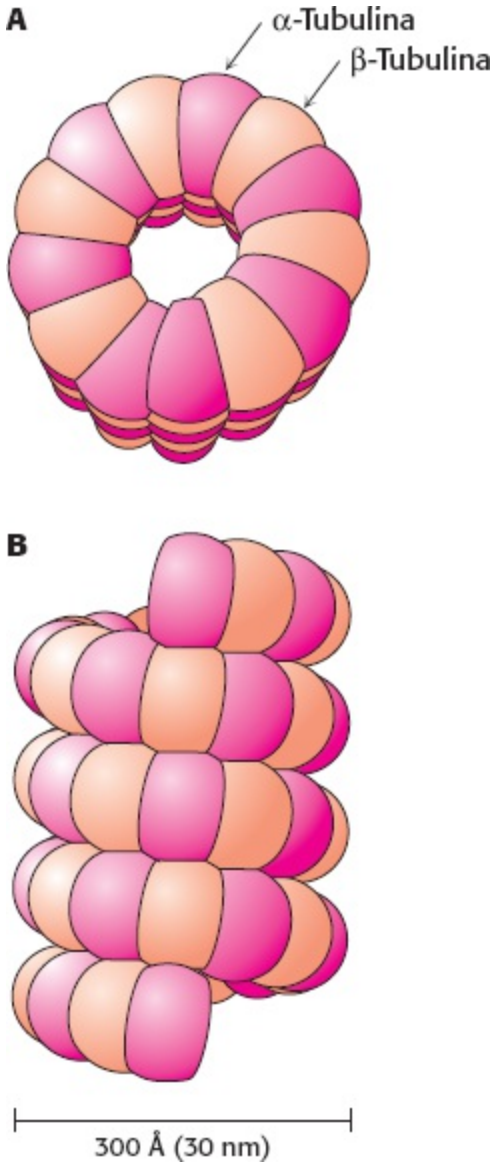


Figura 35.21 Estrutura do microtúbulo. Vistas esquemáticas da estrutura helicoidal de um microtúbulo. A α-tubulina é mostrada em vermelho-escuro, e a β-tubulina, em vermelho-claro. **A**. Vista superior. **B**. Vista lateral.

Os microtúbulos são polímeros cilíndricos ocos

Os *microtúbulos* constituem um importante componente do citoesqueleto. São constituídos por dois tipos de subunidades homólogas de 50 kDa, a tubulina α e β, cuja montagem é feita em um arranjo helicoidal de tipos alternados de tubulina, formando a parede de um cilindro oco (Figura 35.21). Alternativamente, um microtúbulo pode ser considerado como 13 protofilamentos que correm paralelamente a seu eixo longitudinal. O diâmetro externo de um microtúbulo é de 30 nm, ou seja, muito maior que o da actina (8 nm). Como a actina, os microtúbulos são estruturas polares. A

extremidade negativa de um microtúbulo está ancorada próximo ao centro de uma célula, enquanto a extremidade positiva estende-se para a superfície da célula.

Os microtúbulos também são componentes essenciais dos cílios e flagelos presentes em algumas células eucarióticas. Por exemplo, os espermatozoides deslocam-se por meio do movimento dos flagelos contendo microtúbulos. Os microtúbulos presentes nessas estruturas adotam uma arquitetura comum (Figura 35.22). Um feixe de microtúbulos, denominado *axonema*, é circundado por uma membrana contígua à membrana plasmática. O axonema é composto de um grupo periférico de nove pares de microtúbulos circundando dois microtúbulos isolados. Esse motivo repetido é frequentemente denominado *disposição 9 + 2*. A dineína aciona o movimento de um membro de cada par externo em relação ao outro, causando a inclinação de toda a estrutura.

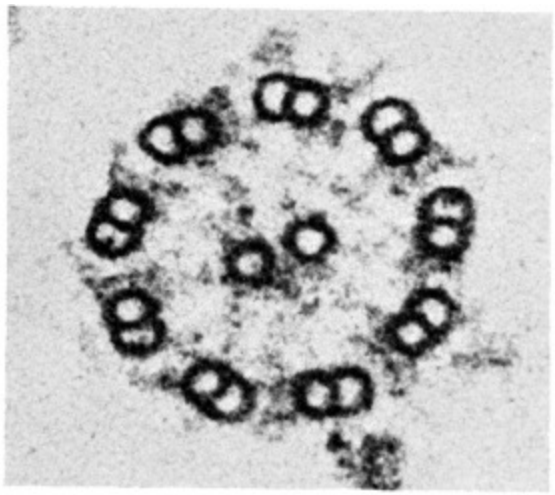


Figura 35.22 Disposição dos microtúbulos. Micrografia eletrônica de um corte transversal de axonema de flagelo, mostrando nove duplas de microtúbulos circundando dois microtúbulos isolados. [Cortesia do Dr. Joel Rosenbaum.]

Os microtúbulos são importantes na determinação das formas das células e na separação dos cromossomos-filhos na mitose. São estruturas altamente dinâmicas, que crescem pela adição de α e β-tubulinas nas extremidades das estruturas existentes. À semelhança da actina, as *tubulinas* ligam-se a nucleosídio trifosfatos e os hidrolisam, embora, no caso da tubulina, o nucleotídio seja GTP, em lugar de ATP. A concentração crítica para a polimerização das formas de tubulina com GTP é mais baixa que aquela para as formas com GDP. Por conseguinte, um microtúbulo recém-formado consiste principalmente em GTP-tubulinas. Com o tempo, o GTP é hidrolisado a GDP. As subunidades de GDP-tubulina no interior de um microtúbulo permanecem polimerizadas de modo estável, enquanto as subunidades de GDP expostas em uma extremidade têm forte tendência a se dissociar. Marc Kirschner e Tim Mitchison observaram que alguns microtúbulos em uma população aumentam, enquanto outros diminuem simultaneamente. Essa propriedade, denominada *instabilidade dinâmica*, surge de flutuações aleatórias na quantidade de subunidades de GTP- ou GDP-tubulina na extremidade positiva do polímero. O caráter dinâmico dos microtúbulos é crucial para processos como a mitose, que necessitam da montagem e desmontagem de estruturas elaboradas baseadas em microtúbulos, como as fibras do fuso.

A estrutura da tubulina foi determinada por métodos de cristalografia de alta resolução (Figura 35.23). Conforme esperado, a partir de sua identidade de sequência de 40%, a α e a β-tubulina apresentam estrutura tridimensionais muito semelhantes. Análises posteriores revelaram que as

tubulinas são membros da família de NTPase com alça P que contêm um sítio de ligação de nucleotídio adjacente à alça P. As tubulinas estão presentes apenas nos eucariotos, embora se tenha encontrado um homólogo procariótico. A análise de sequência identificou uma proteína procariótica, denominada FtsZ (do inglês, *f*ilamentous *t*emperature-*s*ensitive mutant *Z*, mutante *Z* filamentoso sensível à temperatura), que é muito semelhante às tubulinas. A homologia foi confirmada quando a estrutura foi determinada por cristalografia de raios X. É interessante assinalar que essa proteína participa na divisão celular bacteriana, formando estruturas em anel na constrição que surge quando uma célula se divide. Essas observações sugerem que as tubulinas podem ter evoluído a partir de uma antiga proteína de divisão celular.

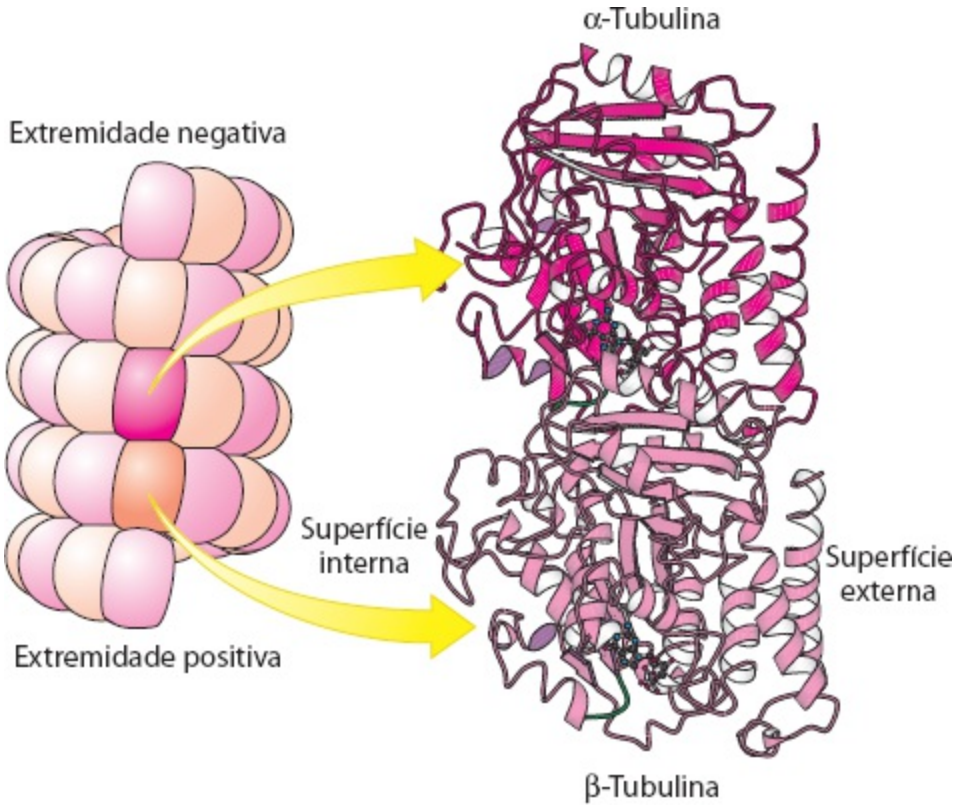
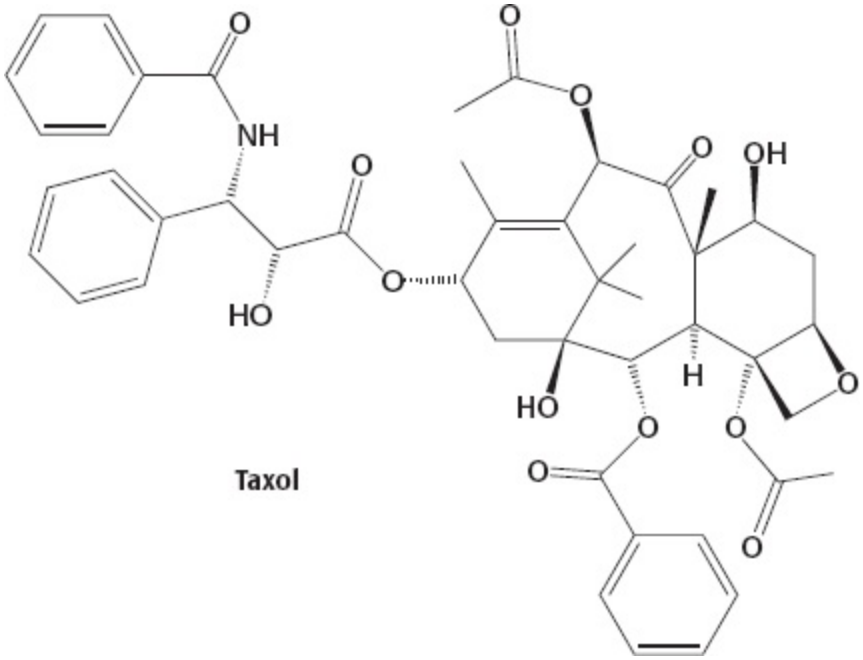


Figura 35.23 Tubulina. Os microtúbulos podem ser vistos como uma montagem de dímeros de α-tubulina – β-tubulina. As estruturas da α-tubulina e da β-tubulina são muito semelhantes. *Observe* que cada uma inclui um domínio de NTPase com alça P (em violeta) e um nucleotídio de guanina ligado. [Desenhada a partir de 1JFF.pdb.]

O contínuo alongamento e encurtamento dos microtúbulos são essenciais para o seu papel na divisão celular. O *taxol*, um composto isolado da casca da árvore teixo do Pacífico, foi descoberto pela sua capacidade de interferir na proliferação celular.

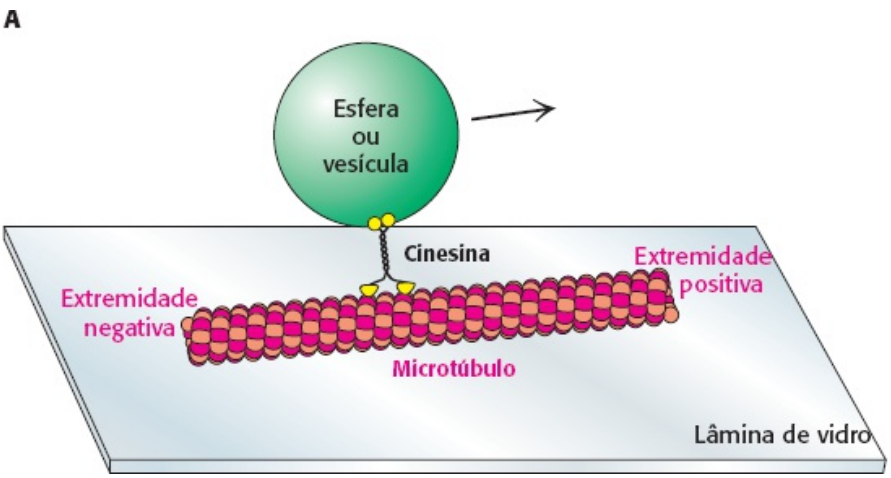


Taxol

O taxol liga-se aos microtúbulos e estabiliza a forma polimerizada. O taxol e seus derivados foram desenvolvidos como agentes antineoplásicos, visto que afetam preferencialmente as células em rápida divisão, como as dos tumores.

O movimento da cinesina é altamente processivo

As cinesinas são proteínas motoras que se movem ao longo de microtúbulos. Vimos que a miosina move-se ao longo dos filamentos de actina por um processo em que a actina é liberada a cada ciclo; um grupo de cabeças de miosina que atua independentemente dissocia-se da actina depois de cada movimento de força (*power stroke*). Por outro lado, quando uma molécula de cinesina move-se ao longo de um microtúbulo, os grupos de duas cabeças da molécula de cinesina operam em sequência: uma se liga e, então, a segunda o faz. Uma molécula de cinesina pode necessitar de muitas etapas antes que ambos os grupos de cabeça se dissociem ao mesmo tempo. Em outras palavras, o movimento da cinesina é altamente processivo. As medidas de uma única molécula possibilitam a observação do movimento processivo (Figura 35.24). Uma única molécula de cinesina tipicamente fará 100 ou mais passos em direção à extremidade positiva de um microtúbulo em um período de segundos antes que a molécula se desprenda do microtúbulo. Essas medidas também revelaram que o comprimento médio do passo é de aproximadamente 80 Å, um valor que corresponde à distância entre subunidades consecutivas de α ou de β-tubulina ao longo de cada protofilamento.



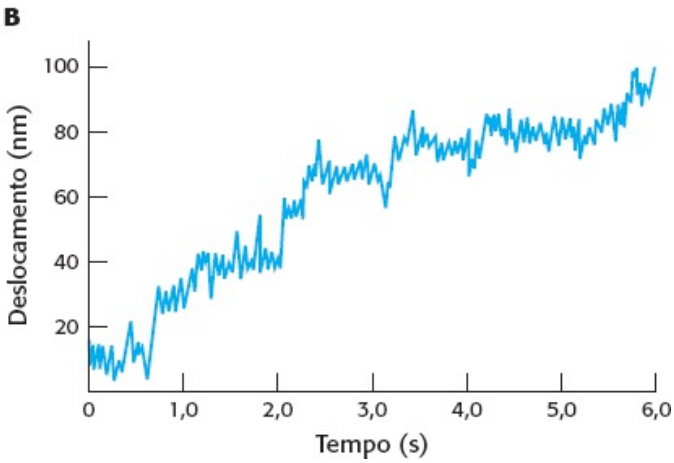


Figura 35.24 Monitoramento dos movimentos mediados pela cinesina. A. O movimento de esferas ou vesículas transportadas por dímeros individuais de cinesina ao longo de um microtúbulo pode ser observado diretamente. **B**. Um traçado mostra o deslocamento de uma esfera transportada por uma molécula de cinesina. Ocorrem múltiplas etapas no intervalo de 6 s. O comprimento médio de cada etapa é de cerca de 8 nm (80 Å). [(B) De K. Svoboda *et al. Nature* 365:721-727, 1993.]

Um outro fato é de suma importância para o desenvolvimento de um mecanismo para o movimento da cinesina: a adição de ATP *aumenta* fortemente a afinidade da cinesina pelos microtúbulos. Esse comportamento contrasta com o da miosina; a ligação do ATP à miosina promove a sua *dissociação* da actina. Essas diferenças significam que a cinesina e a miosina operam por mecanismos totalmente diferentes? Na verdade, não. O movimento gerado pela cinesina parece ocorrer por um mecanismo muito semelhante àquele usado pela miosina (Figura 35.25). Comecemos com uma molécula de cinesina com duas cabeças em sua forma com ADP, dissociada de um microtúbulo. Lembre-se que o pescoço conector liga-se ao domínio da cabeça quando o ATP está ligado e é liberado quando o ADP está ligado. A interação inicial de um dos domínios da cabeça com um dímero de tubulina em um microtúbulo estimula a liberação de ADP desse domínio e a ligação subsequente de ATP. A ligação de ATP desencadeia mudança conformacional no domínio da cabeça, que leva a dois eventos importantes. Em primeiro lugar, a afinidade do domínio da cabeça pelo microtúbulo aumenta, mantendo essencialmente esse domínio no local. No segundo evento, o pescoço conector liga-se ao domínio da cabeça. Essa mudança, transmitida através do domínio em super-hélice que conecta os dois monômeros de cinesina, reposiciona o outro domínio de cabeça. Em sua nova posição, o segundo domínio de cabeça está próximo a um segundo dímero de tubulina, 80 Å ao longo do microtúbulo em direção à extremidade positiva. Enquanto isso, a atividade de ATPase intrínseca do primeiro domínio da cabeça hidrolisa o ATP a ADP e P_i. Quando o segundo domínio de cabeça se liga ao microtúbulo, a primeira cabeça libera ADP e liga-se ao ATP. Mais uma vez, a ligação do ATP favorece a mudança conformacional, que empurra o primeiro domínio para a frente. Esse processo pode continuar por muitos ciclos até que, por acaso, ambos os domínios de cabeça estejam simultaneamente na forma com ADP, e a cinesina se dissocie do microtúbulo. Devido às velocidades relativas das reações componentes, ocorre dissociação simultânea aproximadamente a cada 100 ciclos. Dessa maneira, a cinesina "caminha" uma mão após a outra ao longo do microtúbulo por aproximadamente 100 passos antes que ambas as "mãos" se soltem simultaneamente. Embora estudos recentes tenham descoberto um modelo estrutural para o movimento de força (*power stroke*) da dineína, o mecanismo de sua atuação ainda é desconhecido e representa uma interessante fronteira de pesquisa.

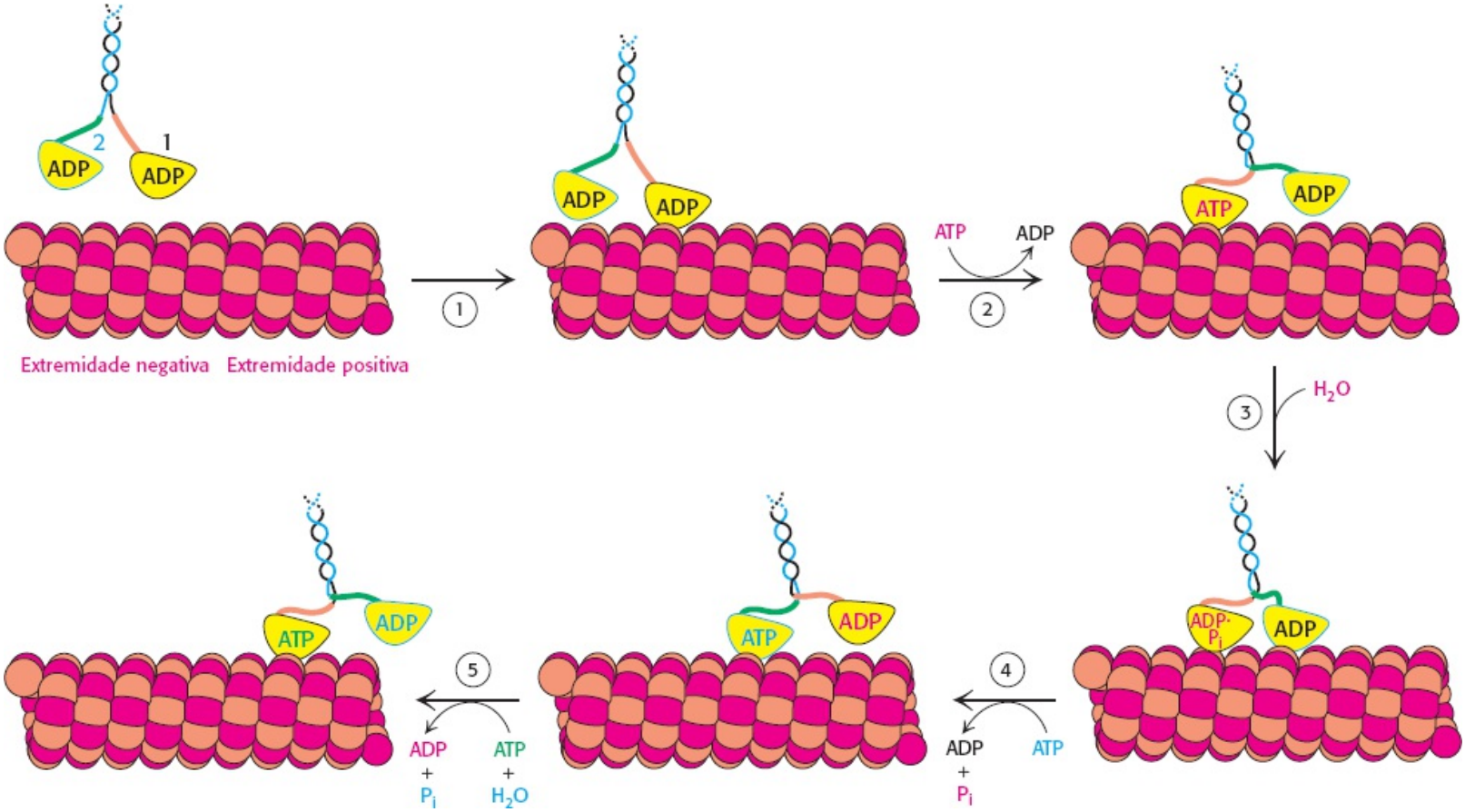


Figura 35.25 Movimento da cinesina ao longo de um microtúbulo. 1. Uma cabeça de uma molécula de cinesina com duas cabeças, inicialmente com ambas na forma com ADP, liga-se a um microtúbulo. **2**. A liberação de ADP e a ligação de ATP resultam em uma mudança conformacional que prende a cabeça ao microtúbulo e traciona o pescoço conector (em laranja) para o domínio da cabeça, fazendo com que o segundo domínio seja arremessado para a extremidade positiva do microtúbulo. **3**. O ATP sofre hidrólise, enquanto a segunda cabeça interage com o microtúbulo. **4**. A troca de ATP por ADP na segunda cabeça traciona a primeira cabeça para fora do microtúbulo, liberando P_i e movendo o primeiro domínio ao longo do microtúbulo. **5**. O ciclo se repete, movendo o dímero de cinesina mais além no microtúbulo.

A cinesina hidrolisa o ATP em uma velocidade de aproximadamente 80 moléculas por segundo. Por conseguinte, em virtude do tamanho do passo de 80 Å por molécula de ATP, a cinesina move-se ao longo de um microtúbulo em uma velocidade de 6.400 Å por segundo. Essa velocidade é consideravelmente menor do que a velocidade máxima da miosina, que se move em relação à actina a 80.000 Å. Entretanto, convém lembrar que o movimento da miosina depende da ação independente de centenas de diferentes domínios de cabeça atuando ao longo do mesmo filamento de actina, enquanto o movimento da cinesina é acionado pela ação processiva de grupos de cabeça de cinesina trabalhando aos pares. A miosina do músculo evoluiu para maximizar a velocidade do movimento, enquanto a cinesina funciona para realizar um transporte constante, porém mais lento, em um sentido ao longo de um filamento.

35.4 Um motor giratório impulsiona o movimento bacteriano

Em 1 s, uma bactéria móvel pode deslocar-se aproximadamente 25 μm, ou cerca de 10 vezes o seu comprimento. Um ser humano correndo em uma velocidade proporcional completaria os 100 m rasos em pouco mais de 5 s. Os motores que acionam esse movimento incrível são notavelmente diferentes dos motores eucarióticos que já examinamos até o momento. No motor bacteriano, um elemento gira

ao redor de um eixo central, em vez de se mover ao longo de um trilho polimérico. O sentido da rotação pode mudar rapidamente, uma característica fundamental para a quimiotaxia, o processo pelo qual as bactérias nadam preferencialmente para uma concentração crescente de determinados compostos úteis e afastam-se dos compostos potencialmente prejudiciais. Um tipo de motor flagelar, impulsionado por um gradiente de Na^+, gira em uma velocidade de 200.000 revoluções por minuto.

As bactérias nadam por rotação de seus flagelos

As bactérias, como *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, nadam mediante rotação dos flagelos que ficam em sua superfície (Figura 35.26). Quando os flagelos giram em sentido anti-horário (visto de fora da bactéria), os flagelos separados formam um feixe que impulsiona com muita eficiência a bactéria através da solução.

Os flagelos bacterianos são polímeros de aproximadamente 15 μm de diâmetro e de até 15 μm de comprimento, constituídos de subunidades de 53 kda de uma proteína denominada *flagelina* (Figura 35.27). Essas subunidades associam-se em uma estrutura helicoidal, que tem 5,5 subunidades por giro, dando a aparência de 11 protofilamentos. Cada flagelo tem um cerne oco. De modo notável, os flagelos não são formados pelo seu crescimento na base adjacente ao corpo celular, e sim pela adição de novas subunidades que passam através do cerne oco e se adicionam à extremidade livre. Cada flagelo é intrinsecamente torcido para a esquerda. Em sua base, cada flagelo apresenta um motor rotatório.

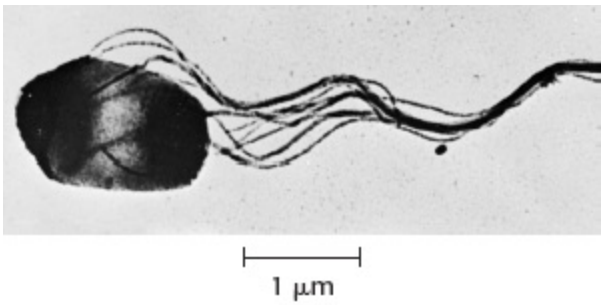


Figura 35.26 Flagelos bacterianos. Micrografia eletrônica de *Salmonella typhimurium* mostrando flagelos em um feixe. [Cortesia do Dr. Daniel Koshland, Jr.]

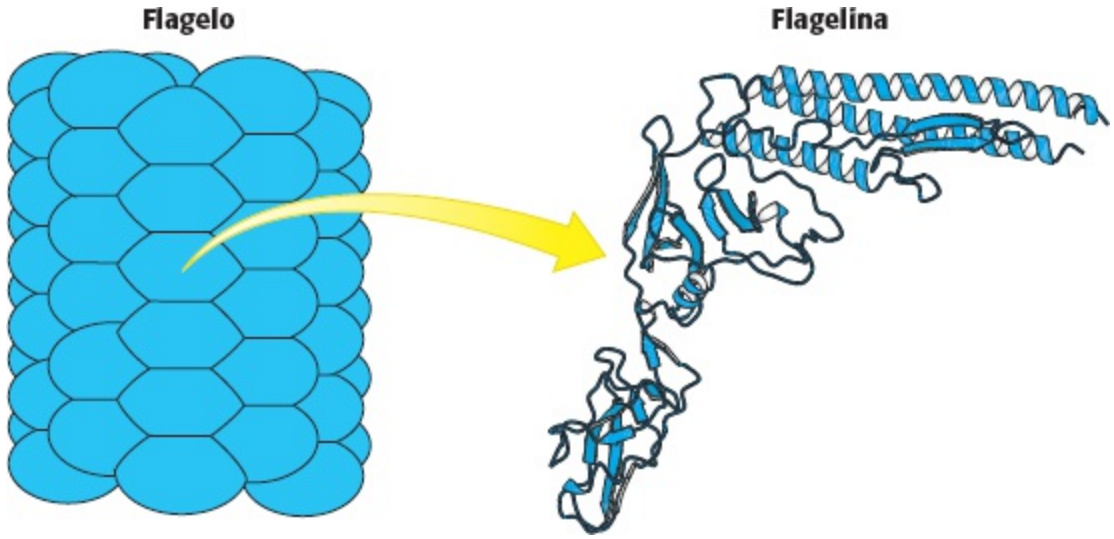


Figura 35.27 Estrutura da flagelina. Um flagelo bacteriano é um polímero helicoidal da proteína flagelina. *Observe* que cada subunidade corresponde a uma estrutura inclinada com uma superfície relativamente plana voltada para o cerne oco do flagelo. [Desenhada a partir de 1IO1.pdb.]

O fluxo de prótons aciona a rotação dos flagelos bacterianos

Os primeiros experimentos realizados por Julius Adler demonstraram que o ATP *não* é necessário para o movimento flagelar. O que aciona esses motores rotatórios? A energia livre necessária deriva do gradiente de prótons que existe através da membrana plasmática. O motor flagelar é muito complexo, contendo até 40 proteínas distintas (Figura 35.28). Foram identificados cinco componentes particularmente cruciais para a função motora a partir de estudos genéticos. A MotA é uma proteína de membrana que parece ter quatro hélices transmembranares, bem como um domínio citoplasmático. A MotB é outra proteína de membrana com uma única hélice transmembranar e um grande domínio periplasmático. Aproximadamente 11 *pares de MotA–Mot B* formam um anel ao redor da base do flagelo. As proteínas *FliG, FliM* e *FliN* fazem parte de uma estrutura em disco, denominada anel MS (membrana e supramembrana), com aproximadamente 30 subunidades FliG que se unem para formar o anel. A estrutura tridimensional da metade carboxiterminal da FliG revela um domínio em forma de cunha com um conjunto de aminoácidos com carga, conservados entre muitas espécies, ao longo do lado espesso da cunha (Figura 35.29).

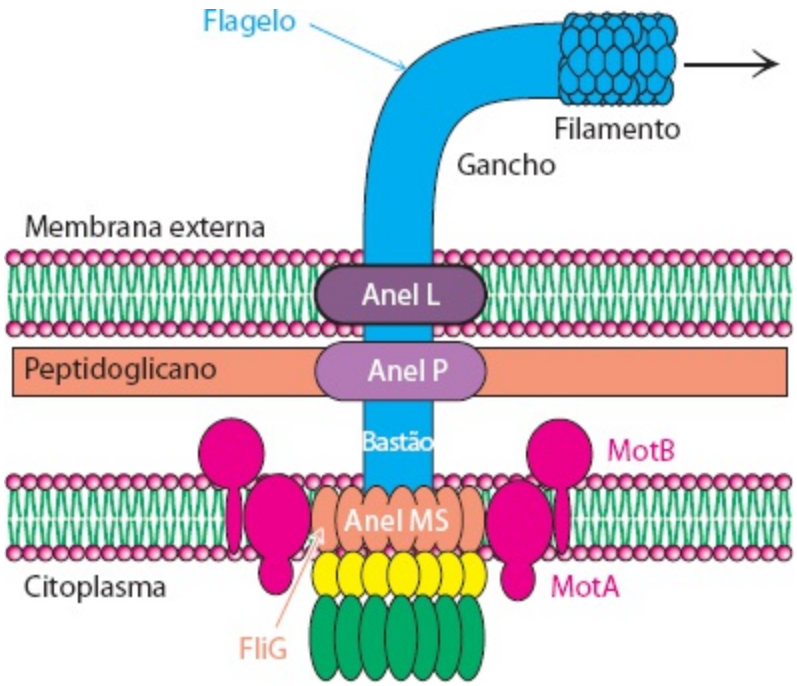


Figura 35.28 Motor flagelar. Vista esquemática do motor flagelar, uma estrutura complexa contendo até 40 tipos distintos de proteína. São mostradas as posições aproximadas das proteínas MotA e MotB (em vermelho), FliG (em laranja), FliN (em amarelo) e FliM (em verde).

O par MotA–MotB e a FliG combinam-se para criar um canal de prótons que aciona a rotação do flagelo. Como o fluxo de prótons através de uma membrana pode impulsionar a rotação mecânica? Esse processo já foi descrito anteriormente em relação à ATP sintase (Seção 18.4). Lembre-se que o elemento-chave para acionar a rotação da subunidade γ da ATP sintase é a subunidade **a** do fragmento F_0. Essa subunidade parece ter dois meios-canais; os prótons só podem atravessar a membrana movendo-se no meio-canal do lado da membrana com maior concentração local de prótons, ligando-se a uma estrutura em disco formada pelas subunidades **c**, ficando sobre essa estrutura durante a sua rotação para a abertura do outro meio-canal e saindo para o lado no qual se encontra a menor concentração local de prótons. Um mecanismo semelhante poderia ser aplicado à rotação flagelar? Com efeito, esse mecanismo foi inicialmente proposto por Howard Berg para

explicar a rotação dos flagelos antes da elucidação do mecanismo rotatório da ATP sintase. Acredita-se que cada par MotA–MotB forme uma estrutura com dois meios-canais; a proteína FliG atua como carreador de prótons giratório, talvez com a participação de alguns dos resíduos dotados de carga, identificados em estudos de cristalografia (Figura 35.30). Nesse cenário, um próton do espaço periplasmático passa para o meio-canal externo e é transferido para uma subunidade FliG. O anel MS gira, rotando o flagelo com ele e possibilitando a passagem do próton para dentro do meio-canal interno e para dentro da célula. Estudos de estrutura e mutagênese estão em andamento e aprimorando essa hipótese.

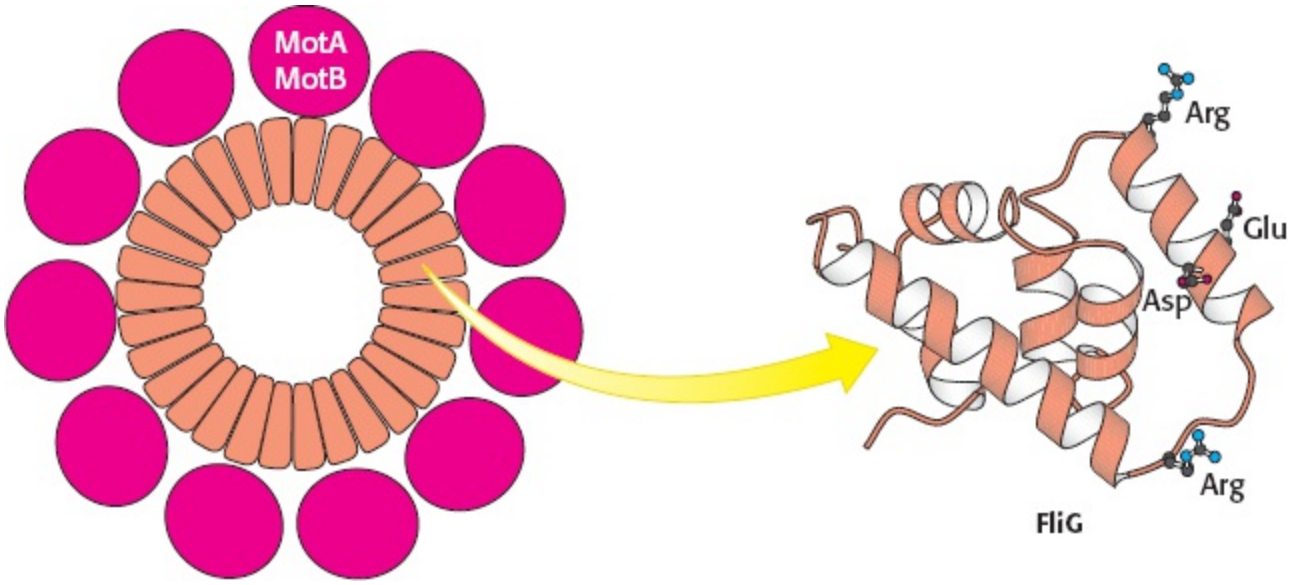


Figura 35.29 Componentes do motor flagelar. Aproximadamente 30 subunidades de FligG são montadas para constituir parte do anel MS. O anel é circundado por cerca de 11 estruturas, que consistem em MotA e MotB. *Observe* que o domínio carboxiterminal da FliG inclui uma crista revestida com resíduos carregados que podem participar no transporte de prótons. [Desenhada a partir de 1QC7.pdb.]

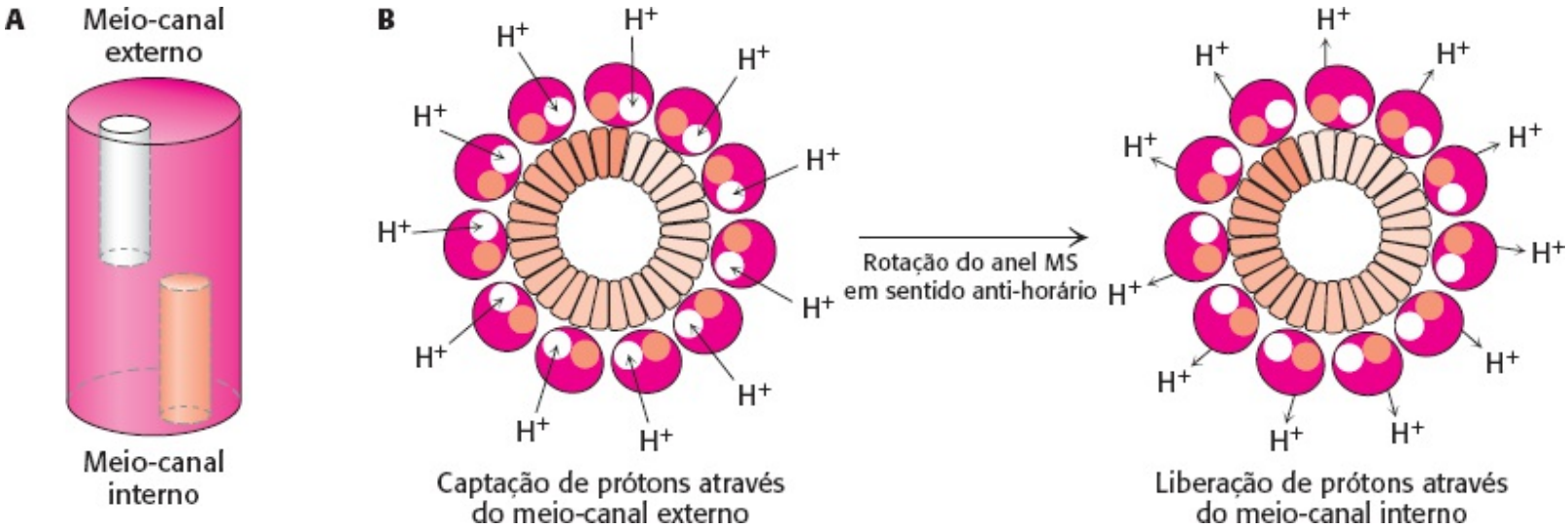


Figura 35.30 Rotação do flagelo acoplada ao transporte de prótons. A. MotA–MotB pode formar uma estrutura com dois meios-canais. **B**. Um modelo para o mecanismo de acoplamento da rotação a um gradiente de prótons requer a captação desses prótons no meio-canal externo e a sua transferência para o anel MS. O anel MS gira em sentido anti-horário, e os prótons são liberados no meio-canal interno. O flagelo está ligado ao anel MS, de modo que ele também roda.

A quimiotaxia das bactérias depende da reversão do sentido da rotação flagelar

Muitas espécies de bactérias respondem a mudanças em seus ambientes ajustando o seu comportamento natatório. O exame dos trajetos tomados é altamente revelador (Figura 35.31). As bactérias nadam em uma direção por algum tempo (tipicamente, cerca de um segundo), dão uma rápida cambalhota e, então, seguem em uma nova direção. O rodopio é causado por uma breve reversão no sentido do motor flagelar. Quando o flagelo gira em sentido anti-horário, os filamentos helicoidais formam um feixe coerente favorecido pela forma intrínseca de cada filamento, e a bactéria nada uniformemente. Quando a rotação é revertida, o feixe se separa, visto que o sentido do giro dos flagelos helicoidais não corresponde ao sentido da rotação. Em seguida, cada flagelo passa para uma direção diferente, e a célula dá um rodopio.

Na presença de um gradiente de determinadas substâncias, como a glicose, as bactérias nadam preferencialmente em direção à maior concentração da substância. Esses compostos são designados como *quimioatraentes*. As bactérias também nadam e afastam-se preferencialmente de compostos potencialmente prejudiciais, como o fenol, um *quimiorrepelente*. O processo de se mover em direções específicas em resposta a sinais ambientais é denominado *quimiotaxia*. Na presença de um gradiente de um quimioatraente, as bactérias nadam por períodos mais longos sem rodopiar, quando se movem em direção a concentrações mais altas do quimioatraente. Por outro lado, elas rodopiam mais frequentemente quando se movem para concentrações menores do quimioatraente. Esse comportamento é revertido para os quimiorrepelentes. O resultado dessas ações consiste em uma *marcha aleatória com tendenciosidade*, que facilita o movimento efetivo em direção a condições mais favoráveis para a bactéria.

A quimiotaxia depende de uma via de sinalização que termina no motor flagelar. A via de sinalização começa com a ligação de moléculas a receptores na membrana plasmática (Figura 35.32). Em sua forma *desocupada*, esses receptores iniciam uma via que leva finalmente à fosforilação de um resíduo de aspartato específico em uma proteína solúvel, denominada *CheY*. Em sua forma fosforilada, a CheY liga-se à base do motor flagelar. Quando ligado à CheY fosforilada, o motor flagelar gira em sentido horário, e não em sentido anti-horário, produzindo o rodopio.

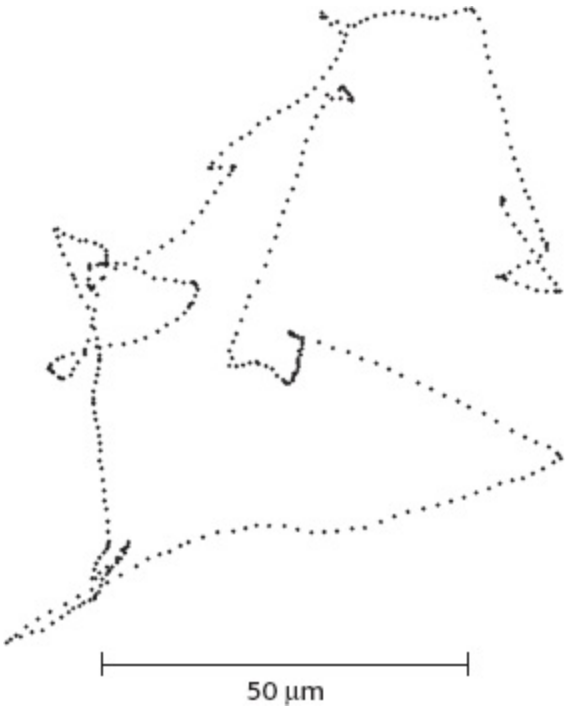


Figura 35.31 Mapeando um trajeto. Esta projeção do trajeto de uma bactéria *E. coli* foi obtida com microscópio que

segue automaticamente o movimento bacteriano em três dimensões. Os pontos mostram as localizações da bactéria a intervalos de 80 ms. [De H. C. Berg. *Nature* 254:389-392, 1975.]

A ligação de um quimioatraente a um receptor de superfície bloqueia a via de sinalização que leva à fosforilação de CheY. A CheY fosforilada sofre hidrólise espontânea e libera o seu grupo fosforila, em um processo acelerado por outra proteína, a CheZ. A concentração de CheY fosforilada cai, e os flagelos tem menos tendência a girar em sentido horário. Nessas condições, as bactérias nadam uniformemente, sem rodopios. Por conseguinte, o motor flagelar rotatório reversível e uma via de sinalização baseada na fosforilação atuam em conjunto para gerar um meio efetivo de responder às condições ambientais.

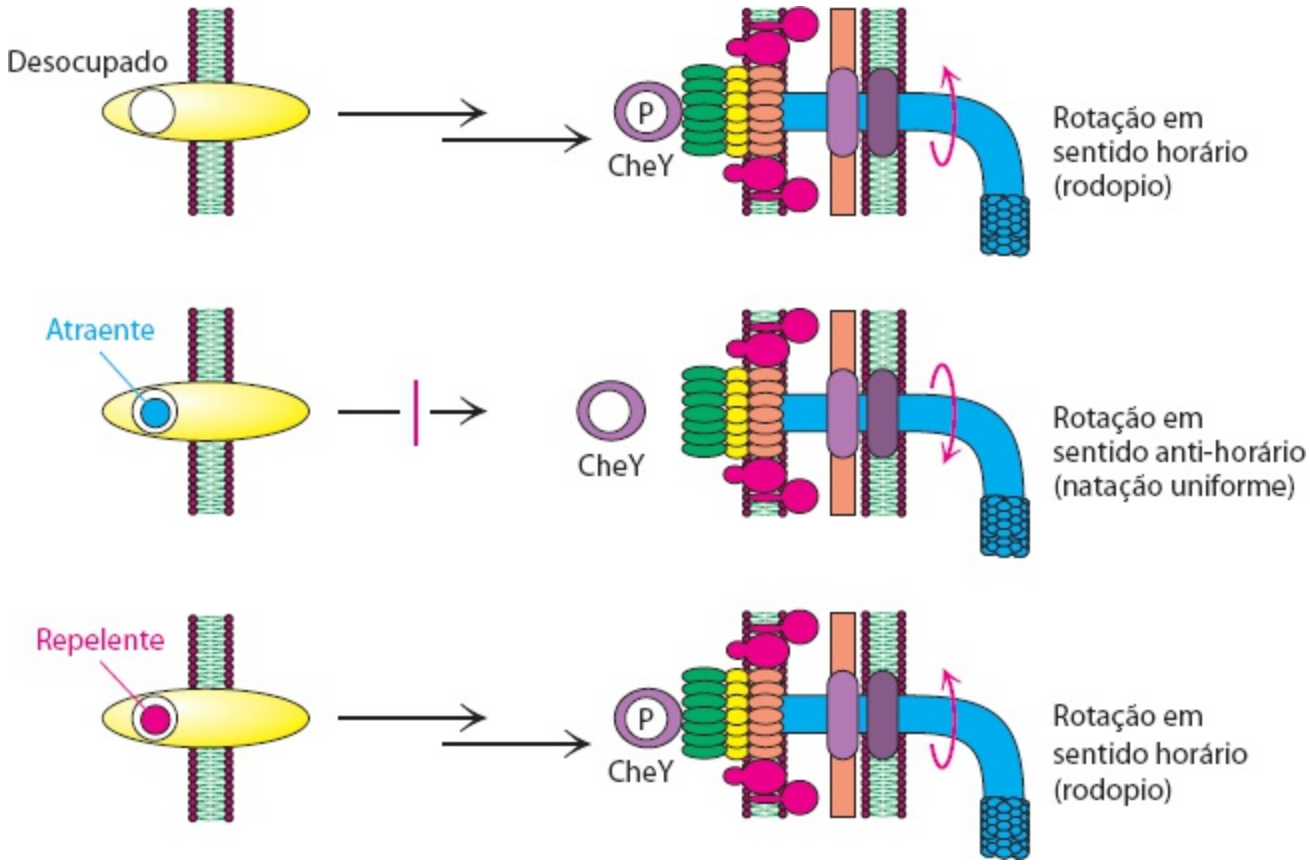


Figura 35.32 Sinalização da quimiotaxia. Receptores na membrana plasmática iniciam uma via de sinalização, que leva à fosforilação da proteína CheY. A CheY fosforilada liga-se ao motor flagelar e favorece a rotação em sentido horário. Quando um atraente liga-se ao receptor, essa via é bloqueada, resultando em rotação flagelar em sentido anti-horário e, portanto, em natação uniforme. Quando ocorre ligação de um repelente, a via é estimulada, levando a um aumento da concentração de CheY fosforilada e, portanto, a uma rotação mais frequente em sentido horário e rodopio.

As bactérias percebem gradientes espaciais de quimioatraentes por medidas separadas no tempo. Uma bactéria começa a seguir uma direção aleatória, e, se a concentração de quimioatraente aumenta após a bactéria ter nadado por algum tempo, a probabilidade de rodopio diminui, e ela continua aproximadamente na mesma direção. Se a concentração diminui, a frequência de rodopios aumenta, e a bactéria testa outras direções aleatórias. O sucesso desse mecanismo mais uma vez revela o poder de resolução evolutiva de problemas; muitas soluções possíveis são tentadas de modo aleatório, e aquelas que são benéficas são selecionadas e exploradas.

Resumo

35.1 As proteínas motoras moleculares são, em sua maioria, membros da superfamília de NTPase com alça P

As células eucarióticas contêm três famílias de proteínas motoras moleculares: as miosinas, as cinesinas e as dineínas. Essas proteínas movem-se ao longo de vias definidas pela actina e pelos citoesqueletos de microtúbulos das células eucarióticas, contribuindo para o movimento das células e do organismo, bem como para o transporte intracelular de proteínas, vesículas e organelas. A despeito de consideráveis diferenças de tamanho e da falta de semelhança detectável no nível da sequência de aminoácidos, essas proteínas são homólogas, contendo estruturas centrais da família de NTPase com alça P. A capacidade dessas estruturas centrais de modificarem suas conformações em resposta à ligação e hidrólise de nucleosídio trifosfatos é essencial para a função do motor molecular. As proteínas motoras são constituídas de domínios motores ligados a estruturas distendidas que servem para amplificar as mudanças conformacionais nos domínios centrais e para ligar esses domínios centrais uns aos outros ou a outras estruturas.

35.2 As moléculas de miosina movem-se ao longo de filamentos de actina

A estrutura móvel do músculo consiste em um complexo de miosina e actina, juntamente com proteínas acessórias. A actina, uma proteína de 42 kDa altamente abundante, sofre polimerização, formando filamentos longos. Cada monômero de actina pode ligar-se ao ATP ou ao ADP. Um domínio motor de miosina move-se ao longo dos filamentos de actina de maneira cíclica, começando com a miosina livre de nucleotídios ligados à actina: (1) o ATP liga-se à miosina, e esta é liberada da actina; (2) a mudança de conformação reversível associada à hidrólise do ATP enquanto ainda está ligado à miosina leva a um grande movimento do braço de alavanca que se projeta do domínio motor; (3) a miosina com ADP e P_i ligados liga-se à actina; (4) o P_i é liberado da miosina, resultando em reposicionamento do braço de alavanca e movimento da actina em relação à miosina; e (5) a liberação de ADP faz com que o domínio motor retorne a seu estado inicial. O comprimento do braço de alavanca determina o tamanho do passo realizado ao longo da actina em cada ciclo. A capacidade de monitorar proteínas motoras moleculares isoladas forneceu testes importantes para hipóteses concernentes à função motora. A contração muscular acarreta o rápido deslizamento de filamentos finos, compostos de actina, em relação aos filamentos espessos, constituídos de miosina. Os filamentos espessos consistem em múltiplas moléculas de miosina ligadas entre si. Cada molécula de miosina tem duas cabeças que podem se ligar à actina e movê-la em relação à miosina, impulsionada pela hidrólise do ATP pela miosina. A contração muscular é regulada pela tropomiosina e pelo complexo de troponina. Essas proteínas impedem a interação da actina com a miosina até que um aumento da concentração de cálcio associado a um impulso nervoso resulte em alterações da troponina e da tropomiosina induzidas pelo cálcio.

35.3 A cinesina e a dineína movem-se ao longo de microtúbulos

A cinesina e a dineína movem-se ao longo de microtúbulos, em lugar da actina. Os microtúbulos são estruturas poliméricas compostas de α e β-tubulina, duas proteínas muito semelhantes de

ligação de guanina nucleotídios. Cada microtúbulo é constituído de 13 protofilamentos com subunidades alternadas de α e β-tubulina. As cinesinas movem-se ao longo de microtúbulos por um mecanismo muito semelhante àquele usado pela miosina para mover-se ao longo da actina, porém com várias diferenças importantes. Em primeiro lugar, a ligação do ATP à cinesina favorece a ligação do domínio motor, e não a dissociação. Em segundo lugar, o movimento de força (*power stroke*) é desencadeado pela ligação do ATP, e não pela liberação de P_i. Por fim, o movimento da cinesina é processivo. As duas cabeças de um dímero de cinesina atuam em conjunto, revezando a ligação e a liberação do microtúbulo, e ocorrem muitas etapas ao longo do microtúbulo antes da dissociação de ambas as cabeças. A maioria das cinesinas move-se em direção à extremidade positiva dos microtúbulos.

35.4 Um motor giratório impulsiona o movimento bacteriano

Muitas bactérias móveis utilizam flagelos rotatórios para a sua locomoção. Quando giram em sentido anti-horário, os múltiplos flagelos presentes na superfície de uma bactéria unem-se para formar um feixe que impulsiona de modo efetivo a bactéria através da solução. Um gradiente de prótons através da membrana plasmática, em lugar da hidrólise do ATP, aciona o motor flagelar. O mecanismo para o acoplamento do transporte transmembranar de prótons com a rotação macromolecular parece ser semelhante àquele utilizado pela ATP sintase. Quando giram em sentido horário, os flagelos se separam, e a bactéria rodopia. As bactérias nadam preferencialmente em direção a quimioatraentes, em um processo denominado quimiotaxia. Quando as bactérias estão nadando em direção a uma concentração crescente de um quimioatraente, o movimento flagelar em sentido horário predomina, e os rodopios são suprimidos, resultando em uma marcha aleatória com tendenciosidade na direção da concentração crescente de quimioatraente.

Palavras-chave

actina (p. 1020)
actina-F (p. 1020)
actina-G (p. 1020)
braço de alavanca (p. 1019)
captura óptica (p. 1023)
CheY (p. 1032)
cinesina (p. 1016)
cinesina convencional (p. 1018)
citoesqueleto (p. 1015)
complexo de troponina (p. 1024)
concentração crítica (p. 1022)
dineína (p. 1016)
flagelina (p. 1030)
FliG (p. 1031)
fragmento S1 (p. 1017)
hélice relé (p. 1019)
instabilidade dinâmica (p. 1027)

microtúbulo (p. 1026)
miofibrila (p. 1024)
miosina (p. 1016)
movimento de força (*power stroke*) (p. 1023)
par MotA–MotB (p. 1031)
pescoço conector (p. 1020)
quimioatraente (p. 1032)
quimiorrepelente (p. 1032)
quimiotaxia (p. 1032)
sarcômero (p. 1024)
tropomiosina (p. 1024)
tubulina (p. 1027)

Questões

1. *Motores diversos*. O músculo esquelético, os cílios dos eucariotos e os flagelos de bactérias utilizam diferentes estratégias para a conversão da energia livre em movimento coerente. Compare esses sistemas de motilidade no que concerne (a) à fonte de energia livre e (b) ao número de componentes essenciais e sua identidade.

2. *Você chama isso lento?* Na velocidade máxima, uma molécula de cinesina move-se a uma velocidade de 6.400 Å por segundo. Tendo em vista as dimensões da região motora de um dímero de cinesina de aproximadamente 80 Å, calcule a sua velocidade em "comprimentos corporais" por segundo. A quanto corresponde essa velocidade em comprimentos corporais para um automóvel de 3 m de comprimento?

3. *Levantamento de peso*. Um único domínio motor de miosina pode gerar uma força de aproximadamente 4 piconewtons (4 pN). Quantas vezes o seu "peso corporal" um domínio motor de miosina pode levantar? Observe que 1 newton = 100 g. Suponha uma massa molecular de 100 kDa para o domínio motor.

4. *Compare e contraste*. Descreva duas semelhanças e duas diferenças entre os filamentos de actina e os microtúbulos.

5. *Tornando mais leve*. Qual o principal papel das cadeias leves na miosina? Na cinesina?

6. *Rigor mortis*. Por que o corpo enrijece após a morte?

7. *Ora se vê, ora não*. Em determinadas condições de concentração estável, os monômeros de actina em sua forma com ATP polimerizam formando filamentos que novamente se dispersam em monômeros de actina livre com o passar do tempo. Explique.

8. *Helicases como motores*. As helicases podem usar o DNA de fita simples como trilhos. Considere uma helicase que se move por uma distância de uma base no sentido $3' \rightarrow 5'$ em cada ciclo. Supondo que a helicase tem a capacidade de hidrolisar o ATP em uma velocidade de 50 moléculas por segundo na presença de um molde de DNA de fita simples, calcule a velocidade da helicase em micrômetros por segundo. Como essa velocidade pode ser comparada com a da cinesina?

9. *Novos movimentos*. Quando bactérias como *E. coli* ficam sem alimento por um tempo suficiente, elas se tornam imóveis. Entretanto, quando essas mesmas bactérias são colocadas em solução ácida, elas voltam a nadar. Explique.

10. *Seguindo direto*. Suponha que você esteja medindo a distância média percorrida pela bactéria *E. coli* ao longo de um percurso retilíneo antes de ela rodopiar em um tempo determinado. Você esperaria alguma mudança dessa distância na presença de um gradiente de quimioatraente? Seria mais longa ou mais curta?

11. *Puxando uma carga*. Considere a ação de uma única molécula de cinesina ao mover uma vesícula ao longo de um trilho de microtúbulo. A força necessária para arrastar uma partícula esférica de raio a a uma velocidade v em um meio com viscosidade η é

$$F = 6\pi\eta\alpha v$$

Suponha que uma esfera de 2 μm de diâmetro seja carreada a uma velocidade de 0,6 μm s^{-1} em um meio aquoso (η = 0,01 poise = 0,01 g cm^{-1} s^{-1}).

(a) Qual a magnitude da força exercida pela molécula de cinesina? Expresse o valor em dinas (1 dina = 1 g cm s^{-2}).

(b) Quanto trabalho é realizado em 1 s? Expresse o valor em ergs (1 erg = 1 dina cm).

(c) Um motor de cinesina hidrolisa aproximadamente 80 moléculas de ATP por segundo. Qual a energia associada à hidrólise desse ATP em ergs? Compare esse valor com o trabalho real executado.

12. *Passos incomuns*. Uma publicação descreve uma molécula de cinesina declarando que ela se move ao longo de microtúbulos com um comprimento de passo de 6 nm. Você duvida. Por quê?

13. *O som de uma mão batendo palmas*. A KIF1A é uma proteína motora que se move em direção à extremidade positiva dos microtúbulos *como monômero*. A KIF1A tem apenas um domínio motor. Que elementos estruturais adicionais você esperaria encontrar na estrutura da KIF1A?

14. *Blocos de construção*. Os filamentos de actina, os microtúbulos e os flagelos bacterianos são todos construídos a partir de pequenas subunidades. Cite três vantagens da montagem de estruturas filamentosas longas a partir de subunidades, e não de uma única proteína longa.

Questão sobre mecanismo

15. *Rotação reversa*. Com base na estrutura proposta na Figura 35.30 para o motor flagelar bacteriano, sugira uma via para o fluxo transmembranar de prótons quando o motor flagelar estiver girando em sentido horário, e não em sentido anti-horário.

Questão | Integração de capítulos

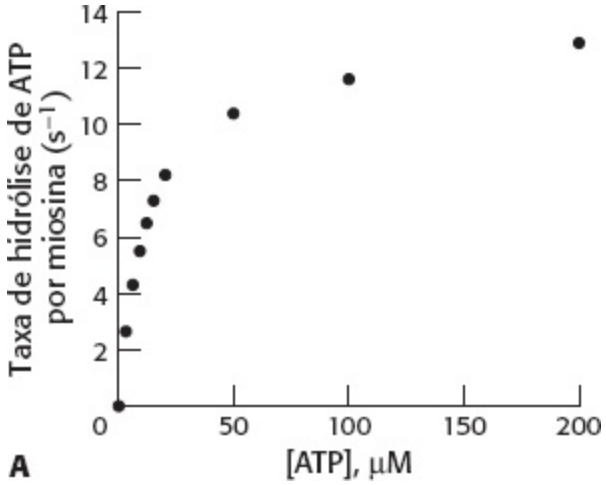
16. *Músculo liso*. O músculo liso, diferentemente do músculo esquelético, não é regulado por um mecanismo de tropomiosina-troponina. Em vez disso, a contração do músculo liso dos vertebrados é controlada pelo grau de fosforilação de suas cadeias leves. A fosforilação induz a contração, enquanto a desfosforilação leva ao relaxamento. À semelhança do músculo esquelético, a contração

do músculo liso é desencadeada por aumento dos níveis de íons cálcio no citoplasma. Proponha um mecanismo para essa ação dos íons cálcio com base em seu conhecimento de outros processos de transdução de sinais.

Questão | Interpretação de dados

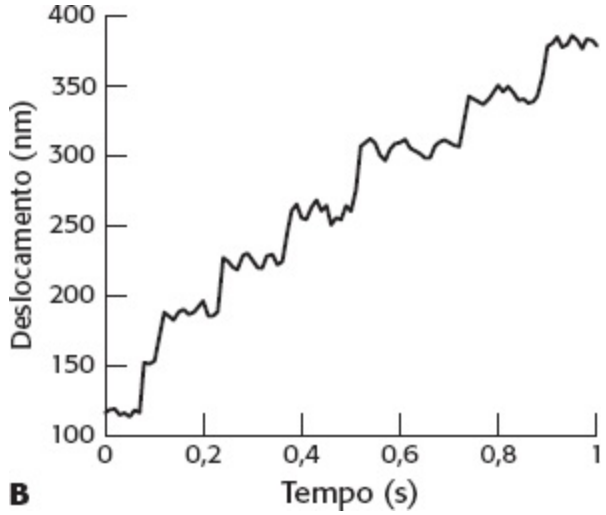
17. *Miosina V*. Um membro abundante da família da miosina, a miosina V é isolada do tecido cerebral. Essa miosina apresenta diversas propriedades incomuns. Em primeiro lugar, com base em sua sequência de aminoácidos, cada cadeia pesada apresenta seis sítios de ligação em série para cadeias leves semelhantes à calmodulina. Em segundo lugar, ela forma dímeros, mas não oligômeros de maior ordem. Por fim, diferentemente de quase todos os outros membros da família de miosinas, a miosina V é altamente processiva.

A taxa de hidrólise de ATP pela miosina foi examinada como função da concentração de ATP, como mostra o gráfico A.



(a) Calcule os valores de k_{cat} e K_m para o ATP.

Com o uso de medidas de captura óptica, foi possível seguir o movimento de dímeros isolados de miosina V, como mostra o gráfico B.



[Baseado em M. Rief *et al. Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:9482-9486, 2000.]

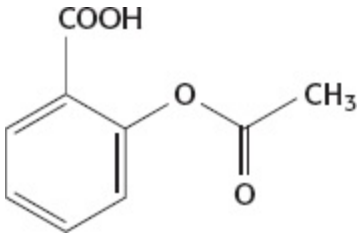
(b) Calcule o comprimento do passo para a miosina V.

Foi constatado que a taxa de liberação de ADP da miosina V é de aproximadamente 13 moléculas por segundo.

(c) Combine as observações sobre a sequência de aminoácidos da miosina, o comprimento do passo observado e os resultados de cinética para propor um mecanismo para o movimento processivo da miosina V.

Desenvolvimento de Fármacos

36



Muitos fármacos baseiam-se em produtos naturais. A Aspirina (ácido acetilsalicílico) (acima) é um derivado químico de um composto isolado da casca do salgueiro (à esquerda). Os extratos de casca de salgueiro são conhecidos há muito tempo pelas suas propriedades medicinais. O composto ativo foi isolado, modificado e, a partir de 1899, embalado para consumidores (destaque à esquerda). [Destaque à esquerda, com autorização da Bayer Corporation. Imagem à esquerda, Image Ideas/Picture Quest.]

SUMÁRIO

36.1 O desenvolvimento de fármacos é um imenso desafio

36.2 Os candidatos a fármacos podem ser descobertos ao acaso, por triagem ou planejamento

36.3 As análises dos genomas são promissoras para a descoberta de fármacos
36.4 O desenvolvimento de fármacos ocorre em vários estágios

O desenvolvimento de fármacos representa uma das interfaces mais importantes entre a bioquímica e a medicina. Na maioria dos casos, os fármacos atuam por meio de sua ligação a receptores específicos ou enzimas, inibindo-os ou, de outro modo, modulando suas atividades. Por conseguinte, o conhecimento dessas moléculas e das vias nas quais participam é crucial para o desenvolvimento de medicamentos. Entretanto, um fármaco efetivo é muito mais do que um modulador potente de seu alvo. Os medicamentos precisam ser administrados prontamente aos pacientes, de preferência na forma de pequenos comprimidos por via oral, e precisam permanecer dentro do corpo por um tempo suficiente para alcançar seus objetivos. Além disso, para evitar efeitos fisiológicos indesejáveis, os fármacos não devem modular as propriedades de outras biomoléculas que não sejam as moléculas-alvo. Esses requisitos limitam tremendamente a quantidade de compostos que têm o potencial de serem fármacos clinicamente úteis.

Os fármacos têm sido descobertos por duas abordagens fundamentalmente opostas (Figura 36.1). A primeira abordagem identifica uma substância que tenha alguma consequência fisiológica desejável quando administrada a um ser humano, a um animal apropriado ou a células. Essas substâncias podem ser descobertas ao acaso, por fracionamento de vegetais ou outros materiais conhecidos por terem propriedades medicinais, ou por triagem de produtos naturais ou outras "bibliotecas" de compostos. Nessa abordagem, um efeito biológico é conhecido antes da identificação do alvo molecular. O modo de ação da substância só é identificado posteriormente, depois de muito trabalho adicional. A segunda abordagem começa com um alvo molecular conhecido. São pesquisados vários compostos, seja por triagem ou pelo planejamento de moléculas com propriedades desejadas, que se liguem à molécula-alvo e modulem suas propriedades. Uma vez disponíveis, os cientistas podem explorar os efeitos desses compostos em células ou organismos apropriados. Muitos resultados inesperados podem ser encontrados nesse processo, à medida que se revela a complexidade dos sistemas biológicos.

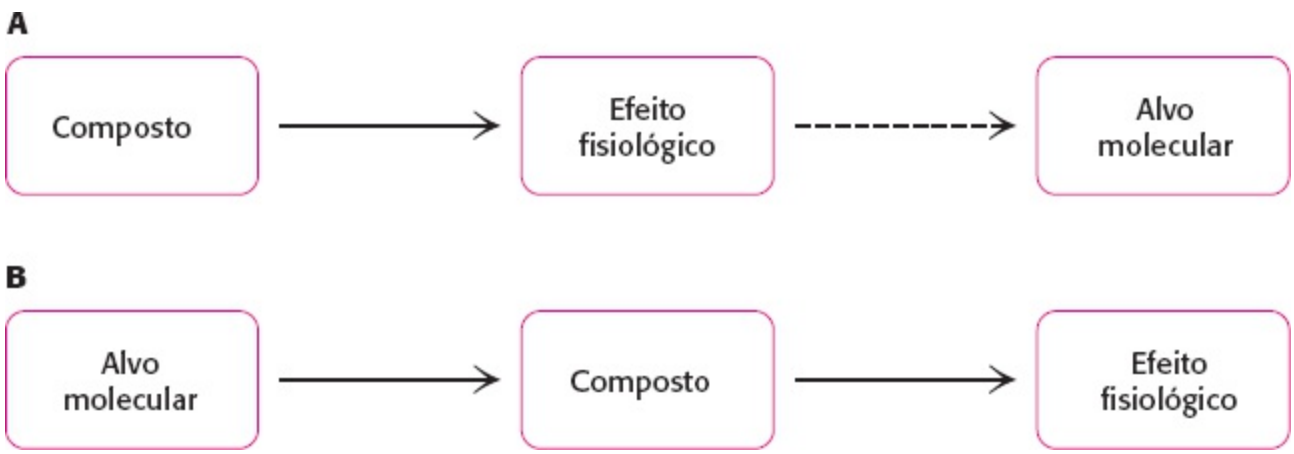


Figura 36.1 Duas vias para a descoberta de fármacos. A. Um composto é descoberto por ter um efeito fisiológico desejável. O alvo molecular pode ser identificado em uma etapa separada, se necessário. **B**. Um alvo molecular é inicialmente selecionado. Os candidatos a fármacos que se ligam ao alvo são identificados e, a seguir, examinados quanto a seus efeitos fisiológicos.

Neste capítulo, investigaremos a ciência da farmacologia. Examinaremos diversas histórias de

casos que ilustram o desenvolvimento de medicamentos – incluindo muito de seus conceitos, métodos e desafios. A seguir, veremos como os conceitos e as ferramentas da genômica estão influenciando as abordagens para o desenvolvimento de fármacos. O capítulo é finalizado com um resumo dos estágios necessários para o desenvolvimento de um fármaco.

Farmacologia

A ciência que trata da descoberta, da química, da composição, da identificação, dos efeitos biológicos e fisiológicos, dos usos e da fabricação de fármacos.

36.1 O desenvolvimento de fármacos é um imenso desafio

Muitos compostos exercem efeitos significativos quando no organismo, porém apenas uma fração muito pequena deles tem o potencial de ser medicamento útil. Um composto exógeno, não adaptado ao seu papel na célula ao longo da evolução, precisa ter várias propriedades especiais para funcionar de modo efetivo, sem causar prejuízo sério. A seguir, iremos considerar alguns dos desafios defrontados pelos pesquisadores que desenvolvem fármacos.

Os candidatos a fármacos precisam ser moduladores potentes de seus alvos

A maioria dos fármacos liga-se a proteínas específicas, habitualmente receptores ou enzimas, dentro do organismo. Para ser efetivo, um fármaco precisa se ligar a uma quantidade suficiente de proteínas-alvo quando tomado em uma dose razoável. Um fator na determinação da eficiência de um fármaco é a força de sua interação com o seu alvo. Uma molécula que se liga a alguma molécula-alvo é frequentemente designada como *ligante*. A Figura 36.2 mostra uma curva de ligação de ligante. As moléculas de ligante ocupam progressivamente mais sítios de ligação do alvo à medida que a concentração do ligante aumenta, até que praticamente todos os sítios disponíveis estejam ocupados. A tendência de um ligante a ligar-se a seu alvo é medida pela *constante de dissociação*, K_d, definida pela expressão

$$Kd = [R]\,[L]/[RL]$$

em que [R] é a concentração do receptor livre, [L] é a concentração do ligante livre, e [RL], a concentração do complexo receptor-ligante. A constante de dissociação é a medida da força de interação entre o candidato a fármaco e o alvo. Quanto menor o valor, mais forte a interação. A concentração de ligante livre em que metade dos sítios de ligação está ocupada é igual à constante de dissociação, contanto que a concentração de sítios de ligação seja substancialmente menor do que a constante de dissociação.

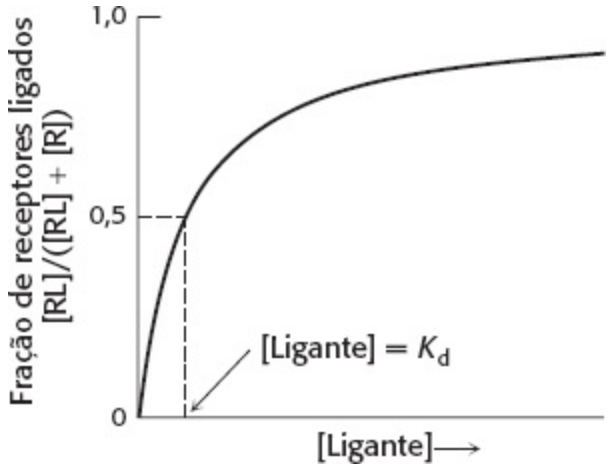


Figura 36.2 Ligação de ligantes. A titulação de um receptor, R, com um ligante, L, resulta na formação do complexo RL. Nos casos não complicados, a reação de ligação segue uma curva de saturação simples. Metade dos receptores está ligada ao ligante quando a concentração deste último se torna igual à constante de dissociação, K_d, para o complexo RL.

Em muitos casos, são utilizados ensaios biológicos no contexto das células ou tecidos vivos (em lugar de ensaios enzimáticos diretos ou de ligação) para examinar a potência dos candidatos a fármacos. Por exemplo, a fração de bactérias mortas por um fármaco poderia indicar a potência de um possível antibiótico. Nesses casos, são usados valores como a EC_{50}. A EC_{50} é a concentração do candidato a fármaco necessária para produzir 50% da resposta biológica máxima (Figura 36.3). De modo semelhante, a EC_{90} é a concentração necessária para alcançar 90% da resposta máxima. No exemplo de um antibiótico, a EC_{90} seria a concentração necessária para matar 90% das bactérias expostas ao fármaco. Para candidatos a fármacos que são inibidores, são frequentemente utilizados os termos correspondentes IC_{50} e IC_{90}para descrever as concentrações do inibidor necessárias para reduzir uma resposta para 50 ou 90% de seu valor, respectivamente, na ausência do inibidor.

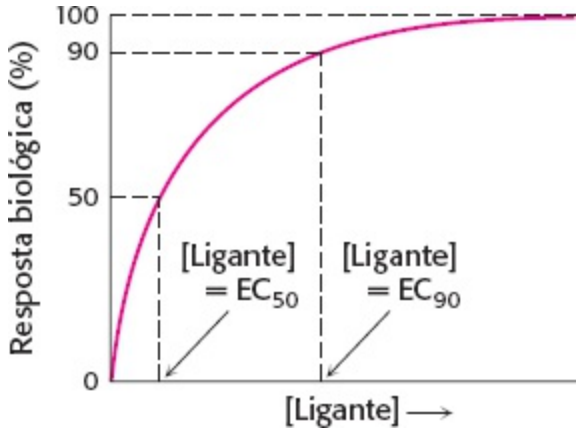


Figura 36.3 Concentrações efetivas. A concentração de um ligante necessária para desencadear uma resposta biológica pode ser quantificada em termos de EC_{50}, a concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima, e EC_{90}, a concentração necessária para produzir 90% da resposta máxima.

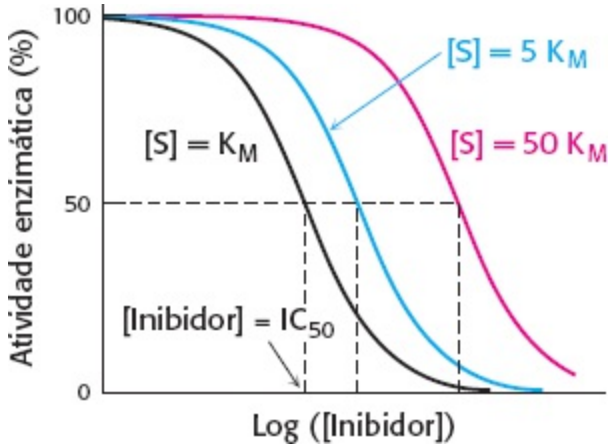


Figura 36.4 Os inibidores competem com substratos pelos sítios ativos das enzimas. A IC_{50} medida de um inibidor competitivo de sua enzima-alvo depende da concentração do substrato presente.

Os valores como a IC_{50} e a EC_{50} são medidas da potência de um candidato a fármaco em modular a atividade do alvo biológico desejado. Para evitar efeitos indesejáveis, frequentemente denominados *efeitos colaterais*, os candidatos ideais a fármacos não devem ligar-se em grau significativo a biomoléculas que não sejam o alvo. O desenvolvimento de um fármaco desse tipo pode ser muito desafiador, particularmente se o alvo do fármaco for um membro de uma grande família de proteínas relacionadas do ponto de vista evolutivo. O grau de especificidade pode ser descrito em termos da razão entre os valores de K_d para a ligação do candidato a quaisquer outras moléculas e o valor de K_d para a ligação do candidato ao alvo desejado.

Muitos fatores que causam complicações são encontrados em condições fisiológicas. Muitos alvos de fármacos ligam-se também a ligantes normalmente presentes nos tecidos; com frequência, os fármacos e esses ligantes competem pelos sítios de ligação no alvo. Este cenário foi mostrado no Capítulo 8, quando discutida a ação dos inibidores competitivos. Suponha que o alvo de um fármaco seja uma enzima, e que o candidato a fármaco seja um inibidor competitivo. A concentração do candidato necessária para inibir a enzima dependerá da concentração fisiológica do substrato normal da enzima (Figura 36.4). Os bioquímicos Yung-Chi Cheng e William Prusoff descreveram a relação entre a IC_{50} de um inibidor enzimático e a sua *constante de inibição* K_i (análoga à constante de dissociação, K_d, de um ligante):

$$IC_{50} = K_i\,(1 + [S]/K_M)$$

Essa relação, designada como *equação de Cheng-Prusoff*, demonstra que a IC_{50} de um inibidor competitivo dependerá da concentração e da constante de Michaelis (K_M) para o substrato [S]. Quanto mais alta a concentração do substrato natural, maior a concentração de fármaco necessária para inibir em determinado grau a enzima.

Os fármacos precisam ter propriedades adequadas para alcançar seus alvos

Até aqui abordamos a capacidade de moléculas de atuar sobre moléculas-alvo específicas. Todavia, um fármaco, para ser efetivo, também precisa ter outras características. Ele deve ser facilmente administrado e precisa alcançar o seu alvo em uma concentração suficiente para ser efetivo. A molécula de um fármaco depara-se com uma variedade de obstáculos em seu trajeto até o alvo, relacionados com a sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção quando no organismo. Esses processos estão inter-relacionados, conforme resumido na Figura 36.5. Consideradas em seu

conjunto, as facilidades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um fármaco são frequentemente designadas como propriedades *ADME* (pronuncia-se "add-me").

Administração e absorção. De modo ideal, um fármaco pode ser tomado por via oral na forma de um pequeno comprimido. Um composto ativo administrado por via oral precisa ter a capacidade de sobreviver às condições ácidas do estômago e, a seguir, ser absorvido pelo epitélio intestinal. Por conseguinte, o composto precisa ser capaz de atravessar as membranas celulares em uma velocidade significativa. As moléculas maiores, como as proteínas, não podem ser administradas por via oral, visto que elas frequentemente não conseguem sobreviver às condições ácidas do estômago, e, se conseguirem, não são prontamente absorvidas. Até mesmo muitas moléculas pequenas não são bem absorvidas, podem ser excessivamente polares, por exemplo, e não atravessar facilmente as membranas celulares. A capacidade de absorção é frequentemente quantificada em termos de *biodisponibilidade oral*. Essa quantidade é definida como a razão entre a concentração máxima de um composto administrado por via oral e a concentração máxima da mesma dose injetada diretamente na corrente sanguínea. A biodisponibilidade pode variar consideravelmente de uma espécie para outra, de modo que os resultados obtidos de estudos em animais podem ser difíceis de aplicar em seres humanos. Apesar dessa variabilidade, foram feitas algumas generalizações úteis. Um conjunto efetivo de generalizações é proporcionado pelas *regras de Lipinski*.

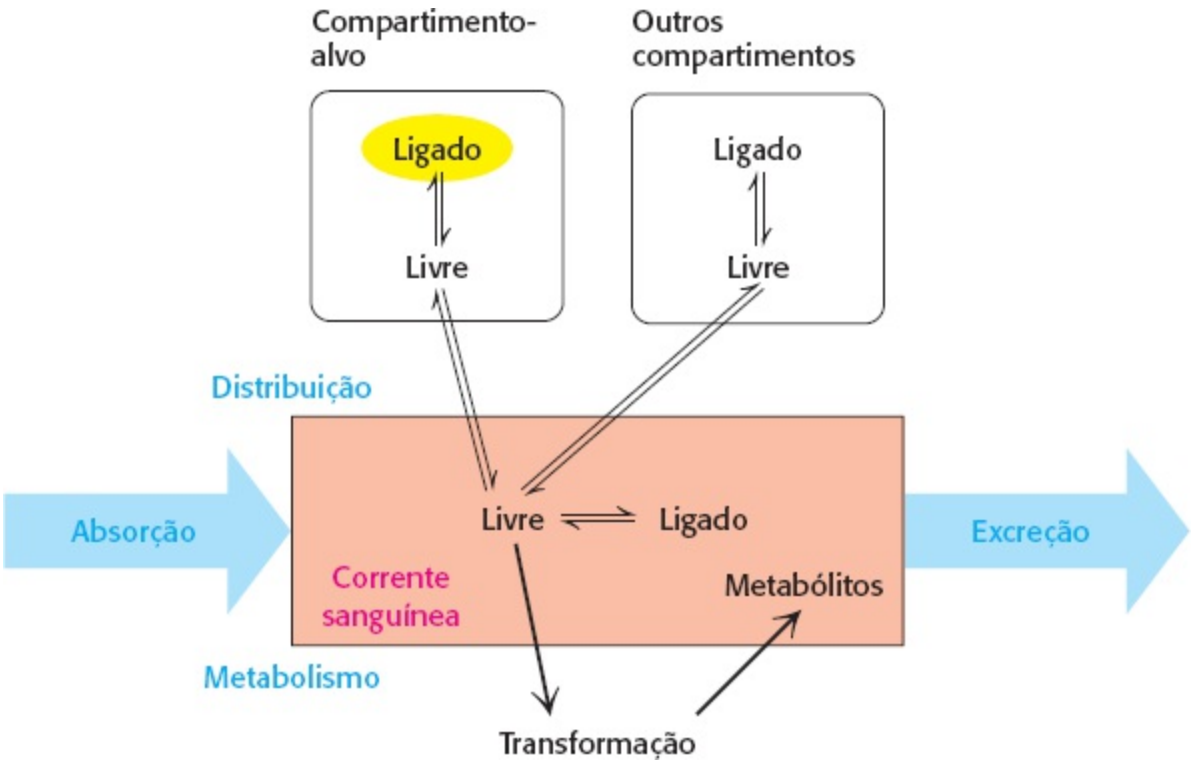


Figura 36.5 Absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). A concentração de um composto em seu sítio-alvo (em amarelo) é afetada pelos graus e velocidades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção.

Essas regras nos dizem que é provável haver pouca absorção quando

1. o peso molecular for maior que 500.
2. a quantidade de doadores de pontes de hidrogênio for superior a 5.
3. a quantidade de aceptores de pontes de hidrogênio for superior a 10.

4. o coeficiente de partição [medido como log(*P*)] for maior que 5.

O coeficiente de partição é uma maneira de medir a tendência de uma molécula a se dissolver em membranas, e esse coeficiente correlaciona-se com a sua capacidade de se dissolver em solventes orgânicos. Para determiná-lo, deixa-se um composto entrar em equilíbrio entre a água e uma fase orgânica, o *n*-octanol. O valor de log(*P*) é definido como o $\log_{10}$ da razão entre a concentração de um composto em *n*-octanol e a concentração do composto em água. Por exemplo, se a concentração do composto na fase de *n*-octanol for 100 vezes a da fase aquosa, então o log(*P*) é igual a 2. Embora a capacidade de partição de um fármaco em solventes orgânicos seja ideal, visto que ela significa que o composto poderá penetrar nas membranas, um valor de log(*P*) muito alto também sugere que a molécula pode ser pouco solúvel em um ambiente aquoso.

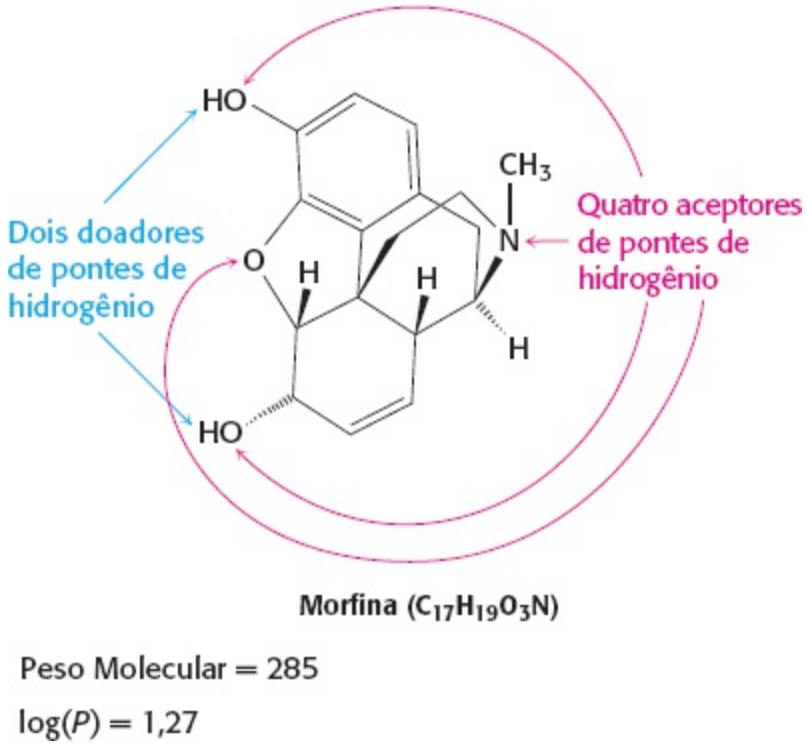


Figura 36.6 Regras de Lipinski aplicadas à morfina. A morfina satisfaz todas as regras de Lipinski e apresenta biodisponibilidade oral de 33% nos seres humanos.

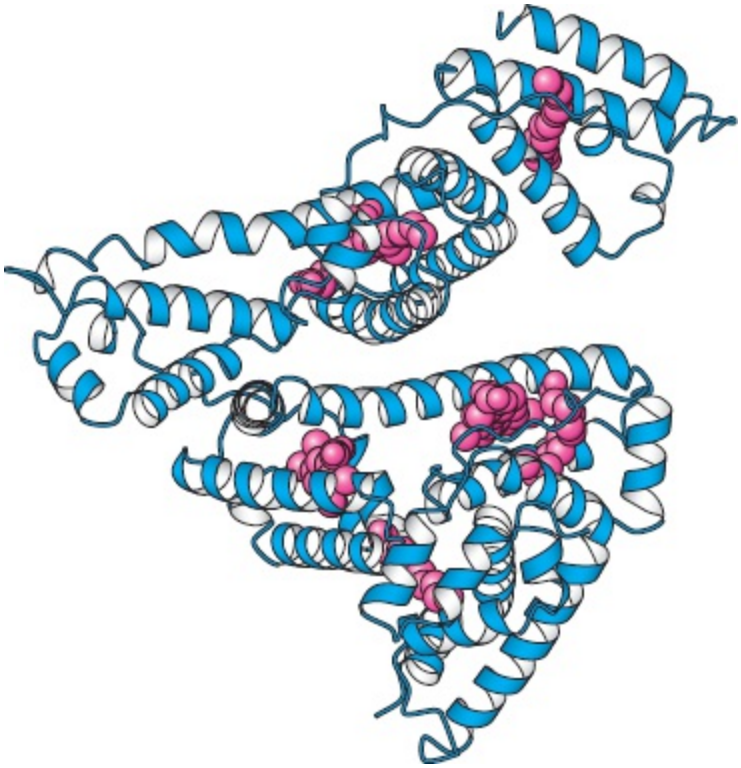
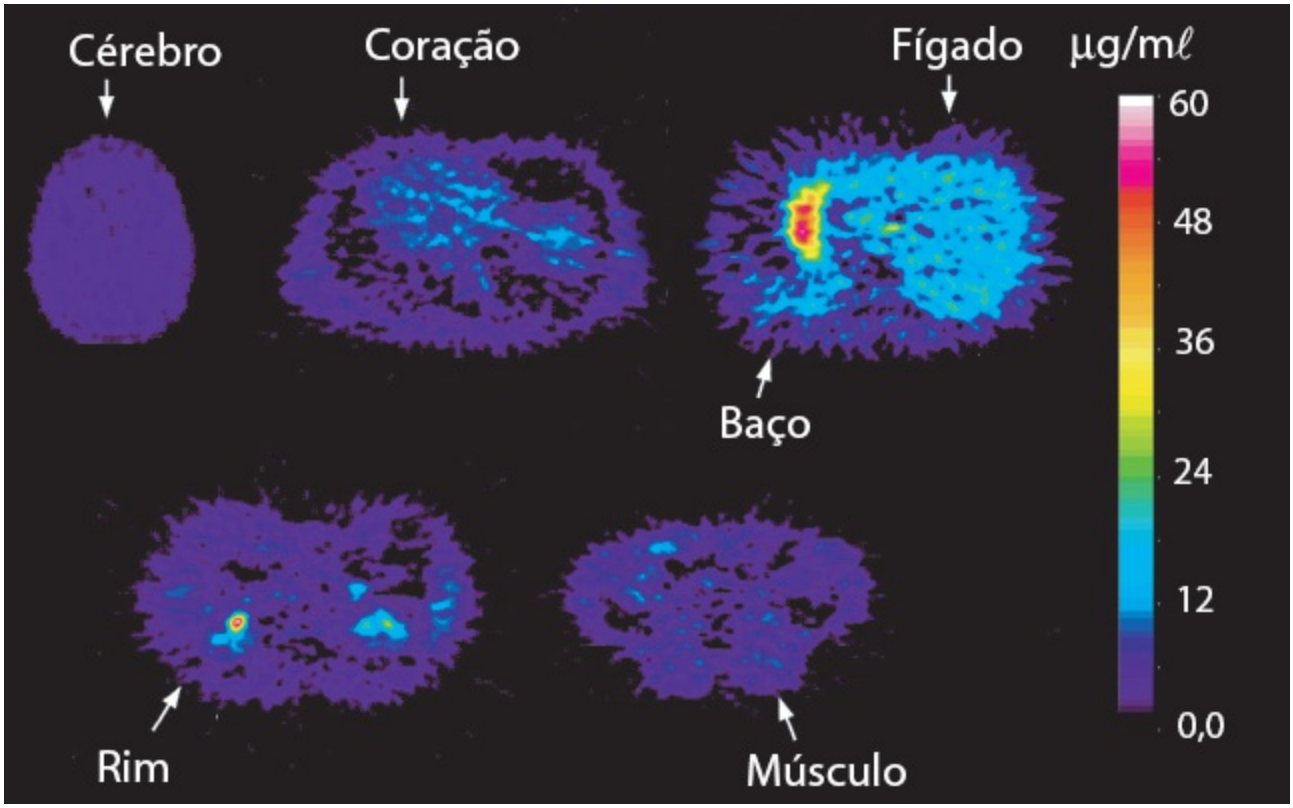


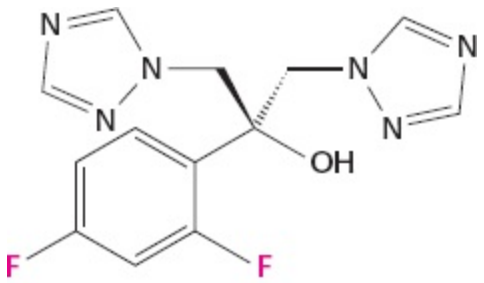
Figura 36.7 Estrutura da albumina sérica humana, o carreador de fármacos. A figura mostra sete moléculas hidrofóbicas (em vermelho) ligadas à molécula. [Desenhada a partir de 1BKE. pdb.]

Por exemplo, a morfina satisfaz todas as regras de Lipinski e apresenta biodisponibilidade moderada (Figura 36.6). Um fármaco que viola uma ou mais dessas regras pode mesmo assim ter biodisponibilidade satisfatória. Entretanto, essas regras servem como principio de orientação como avaliação de novos candidatos a fármacos.

Distribuição. Os compostos captados pelas células epiteliais do intestino podem passar para a corrente sanguínea. Todavia, os compostos hidrofóbicos e muitos outros não se dissolvem livremente na corrente sanguínea. Esses compostos ligam-se a proteínas, como a albumina (Figura 36.7), que estão presentes em quantidades abundantes no sangue, sendo transportados, desse modo, para todos os locais por onde passa a corrente sanguínea.

Quando um composto alcança a corrente sanguínea, ele se distribui para diferentes líquidos e tecidos, que são frequentemente designados como *compartimentos*. Alguns compostos estão altamente concentrados em seus compartimentos-alvo por meio de sua ligação às próprias moléculas-alvo ou por outros mecanismos. Outros compostos exibem uma distribuição mais ampla (Figura 36.8). Um fármaco efetivo irá alcançar o compartimento-alvo em quantidades suficientes; a concentração do composto no compartimento-alvo é reduzida sempre que houver distribuição do composto em outros compartimentos.





Fluconazol

Figura 36.8 Distribuição do fármaco fluconazol. Após a sua administração, os compostos distribuem-se em vários órgãos do corpo. A distribuição do fluconazol, um agente antifúngico, foi monitorada por meio de tomografia por emissão por pósitrons (PET). Essas imagens foram obtidas de um voluntário humano saudável 90 min após a injeção de uma dose de 5 mg kg^{-1} de fluconazol contendo pequenas quantidades de fluconazol marcadas com o isótopo ^{18}F emissor de pósitrons. [De A. J. Fischman *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother*. 37:1270-1277, 1993.]

Alguns compartimentos-alvo são particularmente difíceis de serem alcançados. Muitos compostos são excluídos do sistema nervoso central pela barreira hematencefálica, constituída pelas junções firmes entre as células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos dentro do cérebro e da medula espinal.

Metabolismo e excreção. Um desafio final para uma molécula com potencial de fármaco consiste em escapar das defesas do corpo contra compostos exógenos. Muitos desses compostos (denominados *compostos xenobióticos*) são liberados do corpo na urina ou nas fezes, frequentemente após terem sido metabolizados para ajudar na sua excreção. Esse *metabolismo de fármacos* representa uma considerável ameaça para a eficiência de um fármaco, visto que a concentração do composto desejado diminui à medida que está sendo metabolizado. Por conseguinte, um composto rapidamente metabolizado precisa ser administrado com mais frequência ou em doses mais altas.

Duas das vias mais comuns no metabolismo de xenobióticos são a *oxidação* e a *conjugação*. As reações de oxidação podem ajudar a excreção em pelo menos duas maneiras: aumentando a

hidrossolubilidade e, portanto, a facilidade de transporte, e introduzindo grupos funcionais que participam em etapas metabólicas subsequentes. Essas reações são frequentemente promovidas por enzimas do citocromo P450 no fígado (Seção 26.4). O genoma humano codifica mais de 50 isoenzimas P450 diferentes, muitas das quais participam no metabolismo de xenobióticos. Uma reação típica catalisada por uma isoenzima P450 é a hidroxilação do ibuprofeno (Figura 36.9).

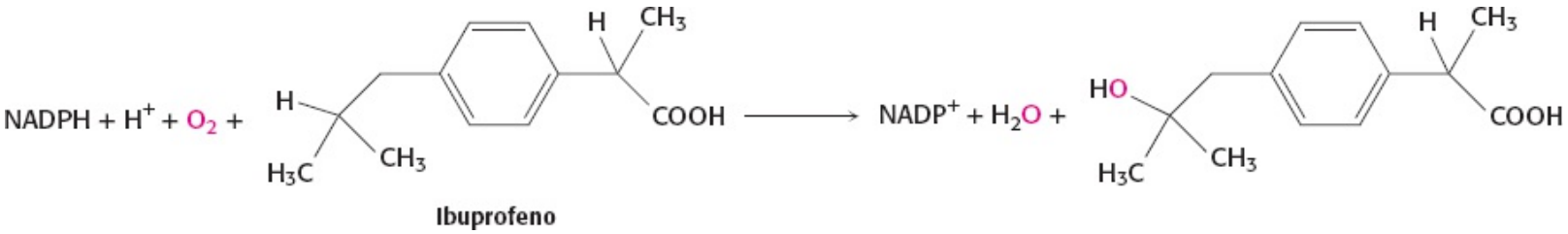
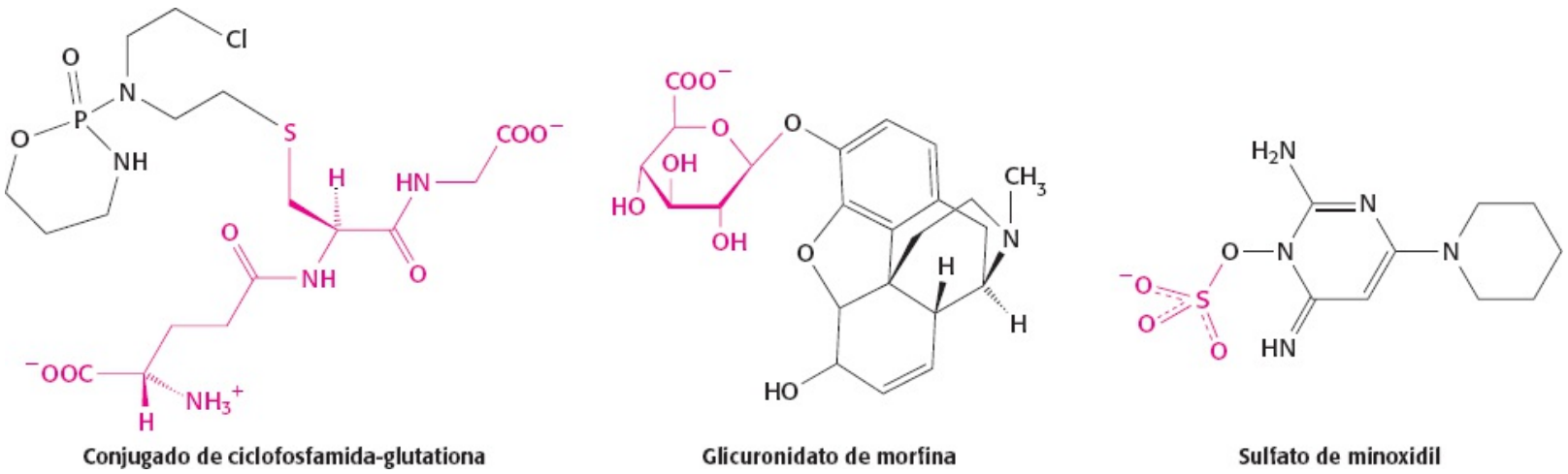


Figura 36.9 Conversão do ibuprofeno pelo P450. As isoenzimas do citocromo P450, principalmente no fígado, catalisam reações metabólicas de xenobióticos, como a hidroxilação. A reação introduz um átomo de oxigênio derivado do oxigênio molecular.

A conjugação refere-se à adição de determinados grupos ao composto xenobiótico. Os grupos comuns acrescentados são a glutationa (Seção 20.5), o ácido glicurônico e o sulfato (Figura 36.10). Com frequência, essas adições aumentam a solubilidade em água e fornecem marcadores que podem ser reconhecidos para a excreção do alvo. Exemplos de conjugação incluem a adição de glutationa ao agente antineoplásico ciclofosfamida, a adição de glicuronidato ao analgésico morfina e a adição de um grupo sulfato ao minoxidil, um estimulador do crescimento de cabelos.



Curiosamente, a sulfatação do minoxidil produz um composto que é mais ativo do que o composto não modificado na estimulação do crescimento de cabelo. Portanto, os produtos metabólicos de um fármaco, embora sejam habitualmente menos ativos do que o fármaco, podem algumas vezes ser mais ativos.

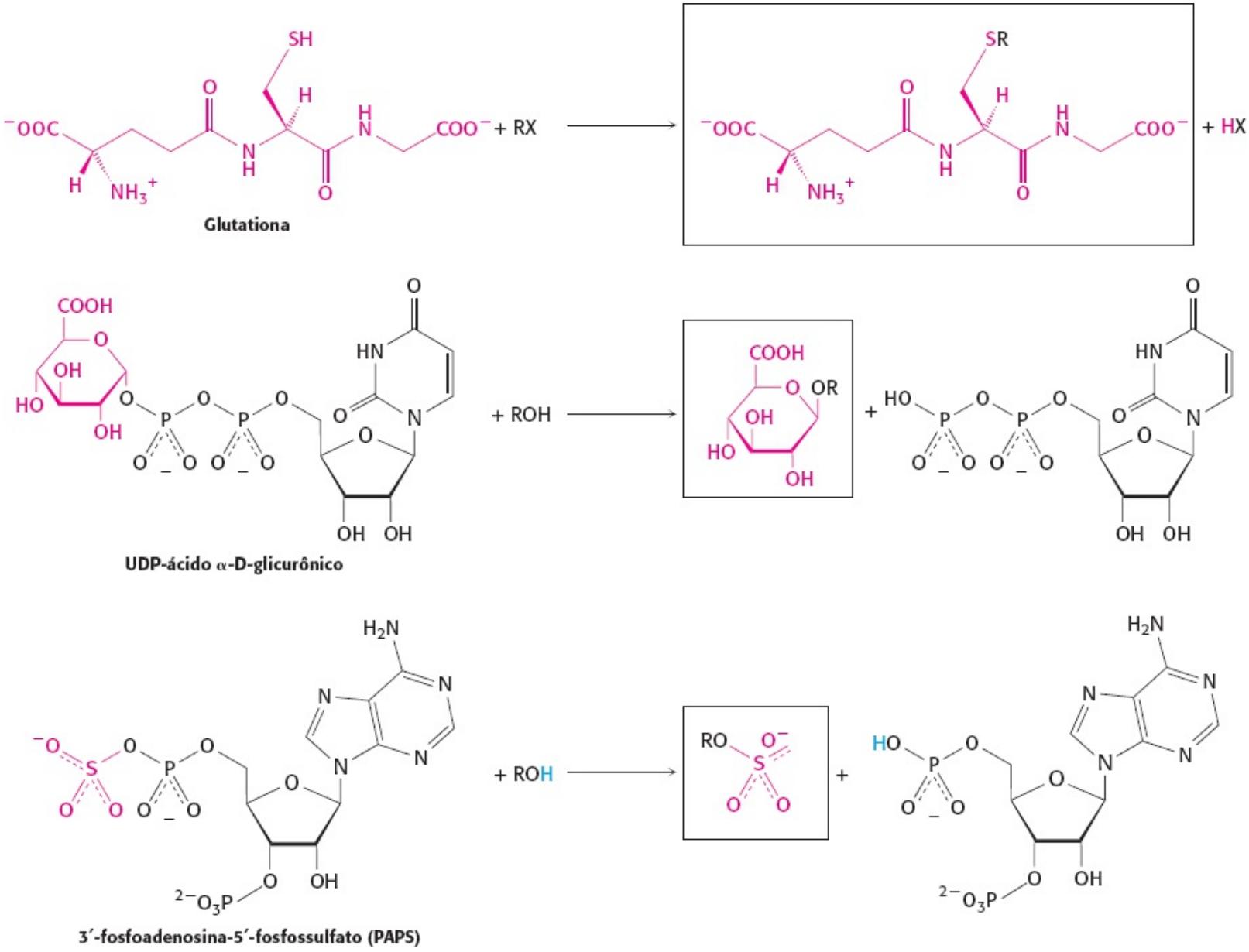


Figura 36.10 Reações de conjugação. Os compostos que apresentam grupos apropriados são frequentemente modificados por reações de conjugação. Essas reações incluem a adição de glutationa (parte superior), de ácido glicurônico (no centro) ou de sulfato (parte inferior). O produto conjugado é mostrado nas caixas.

Observe que uma reação de oxidação frequentemente precede a conjugação, visto que a reação de oxidação pode gerar grupos hidroxila e outros aos quais podem ser acrescentados grupos como o ácido glicurônico. As reações de oxidação dos compostos xenobióticos são frequentemente designadas como *transformações de fase I*, enquanto as reações de conjugação são denominadas *transformações de fase II*. Essas reações ocorrem principalmente no fígado. Como o sangue flui do intestino diretamente para o fígado através da veia porta, o metabolismo dos xenobióticos altera com frequência os fármacos antes de terem alcançado a circulação geral. Esse *metabolismo de primeira passagem* pode limitar de modo substancial a disponibilidade dos compostos administrados por via oral.

Após a sua entrada na corrente sanguínea, os compostos podem ser removidos da circulação e excretados do organismo por duas vias principais. Na primeira, podem ser absorvidos pelos rins e excretados na urina. Nesse processo, o sangue passa pelos *glomérulos*, que consistem em redes de capilares finos no rim que atuam como filtros. Os compostos com pesos moleculares abaixo de aproximadamente 60.000 passam através dos glomérulos. Muitas das moléculas de água, moléculas

de glicose, nucleotídios e outros compostos de baixo peso molecular que passam através dos glomérulos são reabsorvidos na corrente sanguínea, seja por transportadores que apresentam amplas especificidades ou por transferência passiva de moléculas hidrofóbicas através das membranas. Os fármacos e os metabólitos que passam pela primeira etapa de filtração e que não são reabsorvidos são excretados.

Na segunda via, os compostos podem ser ativamente transportados para a bile, um processo que ocorre no fígado. Após concentração na vesícula biliar, a bile flui para o intestino. No intestino, os fármacos e os metabólitos podem ser excretados pelas fezes, reabsorvidos na corrente sanguínea ou, ainda, degradados por enzimas digestivas. Algumas vezes, os compostos são reciclados da corrente sanguínea para o intestino e de volta à corrente sanguínea, em um processo descrito como *ciclo êntero-hepático* (Figura 36.11). Esse processo pode diminuir significativamente a taxa de excreção de alguns compostos, visto que eles escapam de uma via excretora e voltam a entrar na circulação.

A cinética da excreção de compostos é frequentemente complexa. Em alguns casos, uma porcentagem fixa do composto remanescente é excretada durante determinado período de tempo (Figura 36.12). Esse padrão de excreção resulta em perda exponencial do composto da corrente sanguínea, que pode ser caracterizada como meia-vida ($t_{1/2}$). A meia-vida refere-se ao período fixo necessário para eliminar 50% do composto remanescente. Trata-se de uma medida do tempo durante o qual uma concentração efetiva do composto permanece no sistema após a sua administração. Dessa maneira, a meia-vida representa um importante fator para determinar a frequência com que um fármaco precisa ser administrado. Um fármaco com meia-vida longa precisa ser tomado apenas 1 vez/dia, enquanto um medicamento com meia-vida curta precisa ser administrado 3 ou 4 vezes/dia.

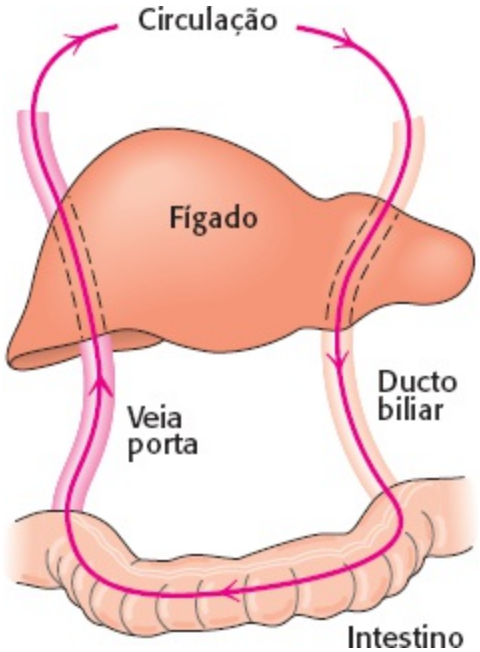


Figura 36.11 Ciclo êntero-hepático. Alguns fármacos podem passar da corrente sanguínea para o fígado, a bile, o intestino, o fígado e de volta à circulação. Esse ciclo diminui a velocidade de excreção do fármaco.

A toxicidade pode limitar a eficiência de um medicamento

Para ser efetivo, um fármaco não deve ser tóxico a ponto de prejudicar seriamente a pessoa que o toma. Um fármaco pode ser tóxico por várias razões. Em primeiro lugar, ele pode modular a própria molécula-alvo com *excessiva* eficiência. Por exemplo, a presença de uma quantidade excessiva do

anticoagulante varfarina pode resultar em sangramento perigoso incontrolável e morte. Em segundo ligar, o composto pode modular as propriedades de proteínas que são distintas da própria molécula-alvo, porém relacionadas com ela. Os compostos direcionados para determinado membro de uma família de enzimas ou receptores ligam-se frequentemente a outros membros da família. Por exemplo, um agente antiviral direcionado contra proteases virais pode ser tóxico se ele também inibir proteases normalmente presentes no corpo, como as que regulam a pressão arterial.

Um composto também pode ser tóxico se ele modular a atividade de uma proteína não relacionada com o seu alvo desejado. Por exemplo, muitos compostos bloqueiam canais iônicos, como o canal de potássio hERG (p. 395), causando distúrbios potencialmente fatais dos batimentos cardíacos. Para evitar efeitos colaterais cardíacos, muitos compostos são submetidos à triagem para a sua capacidade de bloquear esses canais.

Por fim, mesmo quando um composto não é propriamente tóxico, seus subprodutos metabólicos podem ser. Os processos metabólicos de fase I podem gerar grupos reativos lesivos nos produtos. Um importante exemplo é a hepatotoxicidade observada com grandes doses de paracetamol, um analgésico comum (Figura 36.13). Uma isoenzima particular do citocromo P450 oxida o paracetamol a *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina. O composto resultante é conjugado com glutationa. Entretanto, na presença de grandes doses, a concentração hepática de glutationa cai drasticamente, e o fígado não é mais capaz de se proteger desse composto e de outros compostos reativos. Os sintomas iniciais de excesso de paracetamol consistem em náuseas e vômitos. Dentro de 24 a 48 h, podem surgir sintomas de insuficiência hepática. A intoxicação por paracetamol é responsável por cerca de 35% dos casos de insuficiência hepática grave nos EUA. Com frequência, o único tratamento efetivo consiste em transplante de fígado.

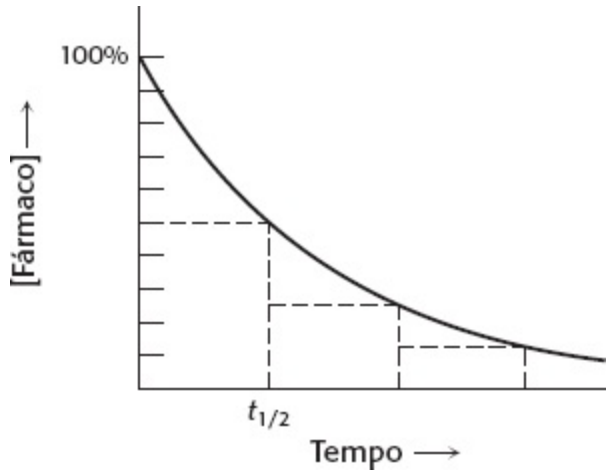


Figura 36.12 Meia-vida da excreção de um fármaco. No caso apresentado, a concentração de um fármaco na corrente sanguínea diminui à metade de seu valor em determinado período de tempo $t_{1/2}$, designado como meia-vida.

A toxicidade de um candidato a medicamento pode ser descrita em termos de *índice terapêutico*. Essa medida de toxicidade é determinada por testes em animais, habitualmente camundongos ou ratos. O índice terapêutico é definido como a razão entre a dose de um composto necessária para matar metade dos animais (denominada LD_{50}, de "dose letal"; do inglês, *lethal dose*) e uma medida comparável da dose efetiva, habitualmente a EC_{50}. Por conseguinte, se o índice terapêutico for de 1.000, a letalidade só será significativa quando for administrada uma quantidade 1.000 vezes a dose efetiva. Índices análogos podem fornecer medidas de toxicidade menos grave do que a letalidade.

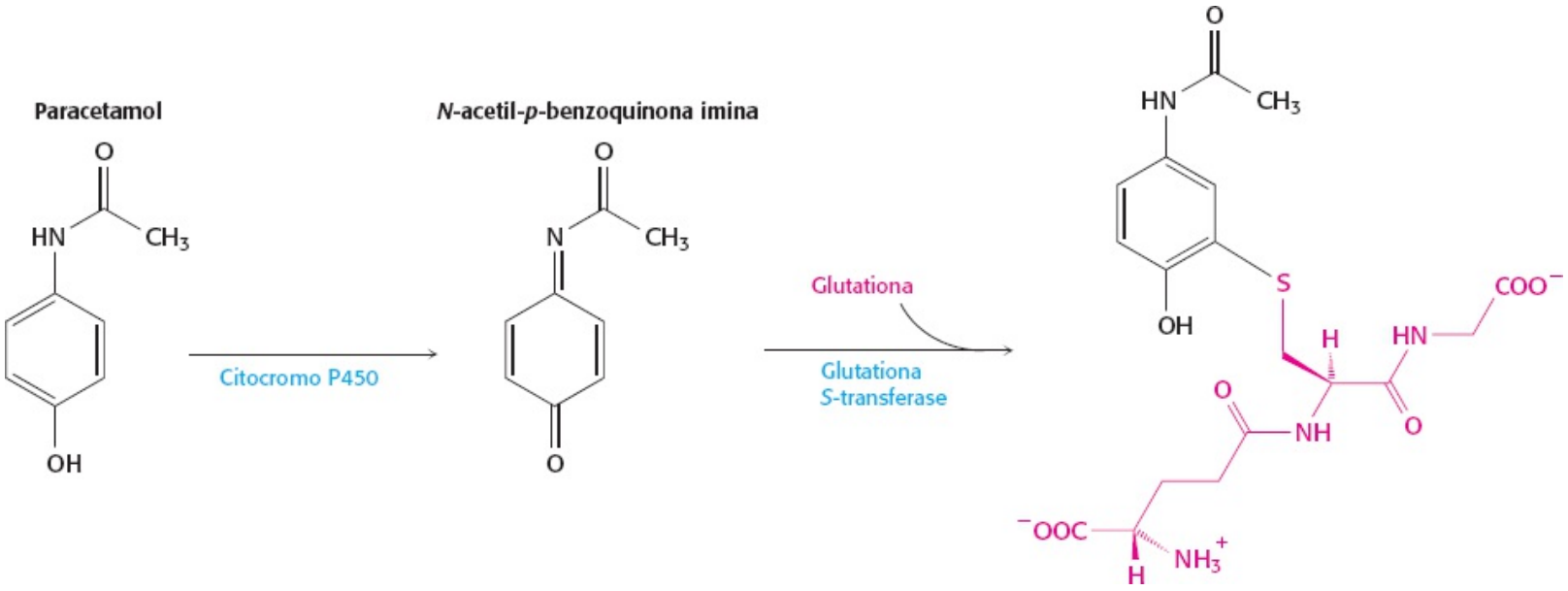


Figura 36.13 Toxicidade do paracetamol. Um produto metabólico secundário do paracetamol é a *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina. Esse metabólito é conjugado com glutationa. O paracetamol em altas doses pode causar depleção das reservas hepáticas de glutationa.

Muitos compostos apresentam propriedades favoráveis *in vitro*; todavia, falham quando administrados a um organismo vivo, devido às dificuldades relacionadas com ADME e com a toxicidade. São necessários estudos caros e demorados em animais para verificar se um candidato a fármaco não é tóxico; todavia, as diferenças de resposta entre espécies animais podem confundir as decisões quanto a prosseguir com um composto para estudos em seres humanos. Com os maiores conhecimentos na bioquímica desses processos, espera-se que os cientistas possam desenvolver modelos computadorizados para substituir os testes em animais ou ampliá-los. Esses modelos teriam que prever de modo acurado o destino de um composto dentro de um organismo vivo a partir de sua estrutura molecular ou outras propriedades facilmente medidas no laboratório, sem o uso de animais.

36.2 Os candidatos a fármacos podem ser descobertos ao acaso, por triagem ou planejamento

Tradicionalmente, muitos fármacos foram descobertos ao acaso ou por observações casuais. Mais recentemente, foram descobertos fármacos por triagem de coleções de produtos naturais ou outros compostos, à procura de moléculas com propriedades medicinais desejadas. De modo alternativo, os cientistas vêm planejando candidatos específicos a medicamentos, utilizando os conhecimentos acerca de um alvo molecular previamente selecionado. Analisaremos vários exemplos de cada uma dessas vias para revelar princípios em comum.

Observações ao acaso podem impulsionar o desenvolvimento de fármacos

Talvez a observação mais bem conhecida na história do desenvolvimento de medicamentos seja a observação de Alexander Fleming feita ao acaso, em 1928, de que colônias da bactéria *Staphylococcus aureus* morriam quando estavam adjacentes a colônias do fungo *Penicillium notatum*. Os esporos do fungo caíram acidentalmente nas placas onde cresciam as bactérias. Fleming logo percebeu que o fungo produzia uma substância capaz de matar bactérias causadoras de doenças.

Essa descoberta levou a uma abordagem fundamentalmente nova para o tratamento das infecções bacterianas. Howard Florey e Ernest Chain desenvolveram um tipo da substância em pó, denominada penicilina, que se tornou um antibiótico amplamente utilizado na década de 1940.

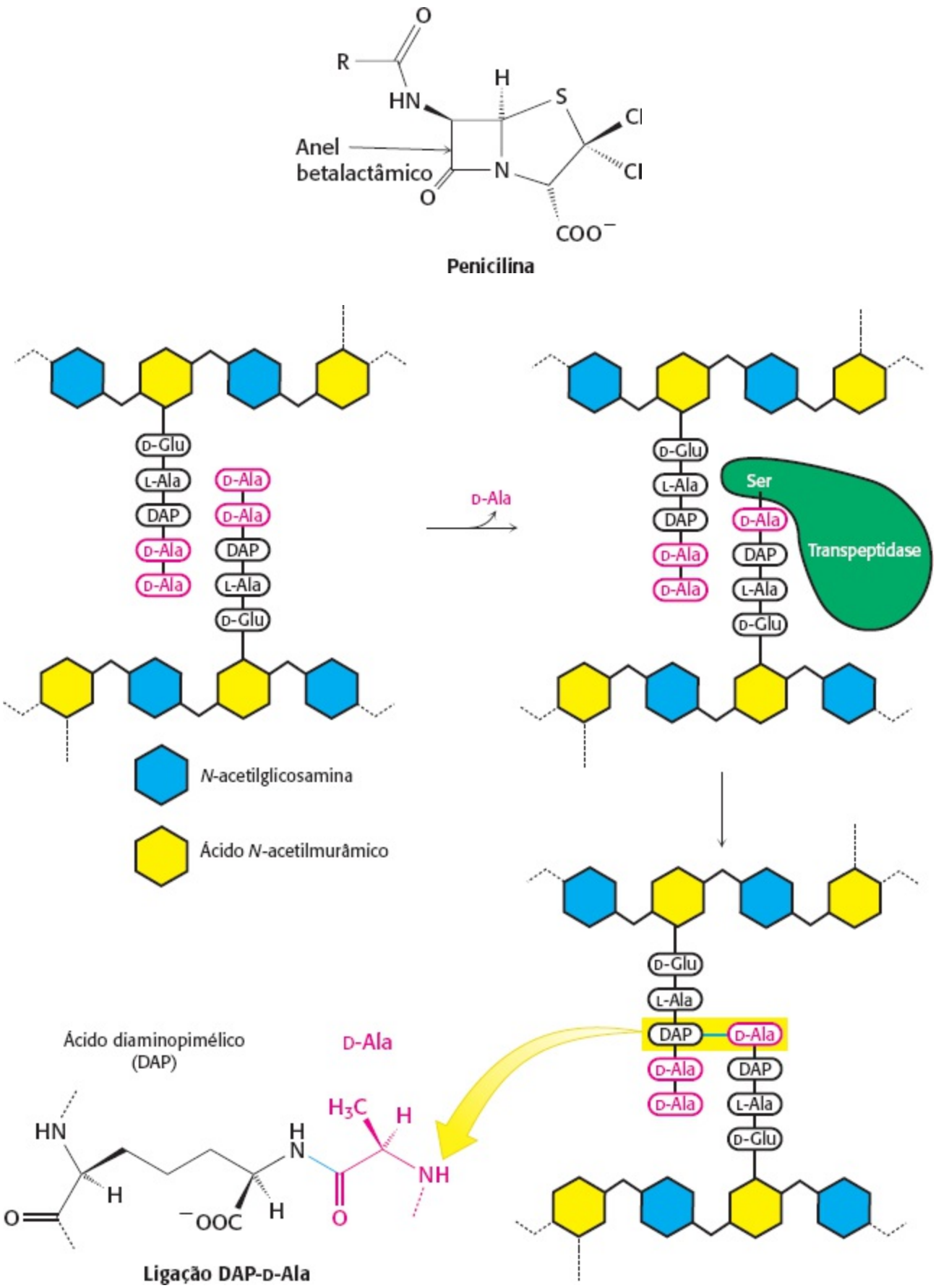
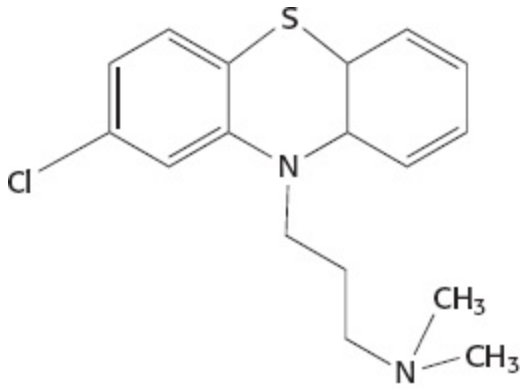


Figura 36.14 Mecanismo de biossíntese da parede celular desestruturado pela penicilina. Uma enzima transpeptidase catalisa a formação de ligações cruzadas entre grupos de peptidoglicano. No caso ilustrado, a

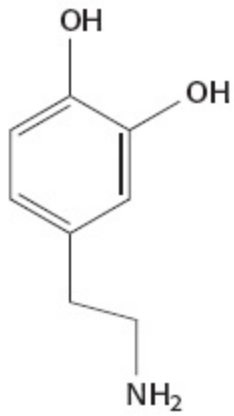
transpeptidase catalisa a ligação da D-alanina na extremidade de uma cadeia peptídica ao aminoácido, o ácido diaminopimélico (DAP), em outra cadeia peptídica. A ligação do ácido diaminopimélico (embaixo à esquerda) é encontrada em bactérias gram-negativas como *E. coli*. São encontradas ligações de peptídios ricos em glicina nas bactérias gram-positivas. A penicilina inibe a ação da transpeptidase; por conseguinte, as bactérias expostas ao fármaco apresentam paredes celulares fracas que são suscetíveis a lise.

A estrutura desse antibiótico foi elucidada em 1945. A característica mais notável dessa estrutura é o anel betalactâmico de quatro membros. Essa característica incomum é fundamental para a função antibacteriana da penicilina, conforme assinalado anteriormente (Seção 8.5).

Três etapas foram cruciais para aproveitar totalmente a descoberta de Fleming. Em primeiro lugar, foi desenvolvido um processo industrial para a produção, em larga escala, da penicilina a partir do fungo *Penicillium*. Na segunda etapa, a penicilina e seus derivados foram sintetizados quimicamente. A disponibilidade de derivados sintéticos da penicilina abriu o caminho para os cientistas explorarem as relações entre estrutura e função. Muitos desses derivados da penicilina têm ampla aplicação em medicina. Por fim, em 1965, Jack Strominger e James Park independentemente determinaram que a penicilina exerce sua atividade antibiótica bloqueando uma reação crítica da transpeptidase na biossíntese da parede celular bacteriana (Figura 36.14), conforme apresentado na Seção 8.5.



Clorpromazina



Dopamina

Muitos outros fármacos foram descobertos por observações casuais. A clorpromazina, um fármaco antineuroléptico, foi descoberta no curso de pesquisas direcionadas para o tratamento do choque em pacientes cirúrgicos. Em 1952, o cirurgião francês Henri Laborit verificou que, após tomarem o composto, seus pacientes ficavam notavelmente calmos. Essa observação sugeriu que a

clorpromazina poderia beneficiar pacientes psiquiátricos, e, com efeito, o medicamento foi utilizado durante muitos anos para o tratamento de pacientes com esquizofrenia e outros transtornos. O fármaco apresenta efeitos colaterais significativos e foi suplantado, em grande parte, por medicamentos desenvolvidos mais recentemente.

A clorpromazina atua por meio de sua ligação a receptores do neurotransmissor dopamina, bloqueando-os (Figura 36.15). Os receptores dopamínicos D2 constituem os alvos de muitos outros fármacos psicoativos. Na busca de medicamentos com efeitos colaterais mais limitados, foram conduzidos estudos para correlacionar os efeitos dos fármacos com parâmetros bioquímicos, como constantes de dissociação e constantes de ligação e taxa de liberação.

Um exemplo mais recente de um medicamento descoberto por observação ao acaso é a sildenafila. Esse composto foi desenvolvido como inibidor da fosfodiesterase 5, uma enzima que catalisa a hidrólise do cGMP a GMP (Figura 36.16). Ele foi planejado para o tratamento da hipertensão arterial e da angina, visto que o cGMP desempenha um papel central no relaxamento das células musculares lisas dos vasos sanguíneos (Figura 36.17). Esperava-se que a inibição da fosfodiesterase 5 aumentasse a concentração de cGMP ao bloquear a via de sua degradação. No curso de estudos clínicos iniciais no País de Gales, alguns homens relataram ereções penianas incomuns. Não estava claro se essa observação casual por alguns homens era devida ao composto ou a outros efeitos. Entretanto, a observação fazia algum sentido bioquímico, pois foi descoberto que o relaxamento do músculo liso devido a níveis aumentados de cGMP contribuía para a ereção peniana. Estudos clínicos subsequentes, direcionados para a avaliação da sildenafila para a distensão erétil, tiveram sucesso. Esse relato testemunha a importância da coleta de informações detalhadas dos participantes de estudos clínicos. Nesse caso, observações incidentais levaram a um novo tratamento para a disfunção erétil e ao aumento da venda do medicamento, de bilhões de dólares por ano.

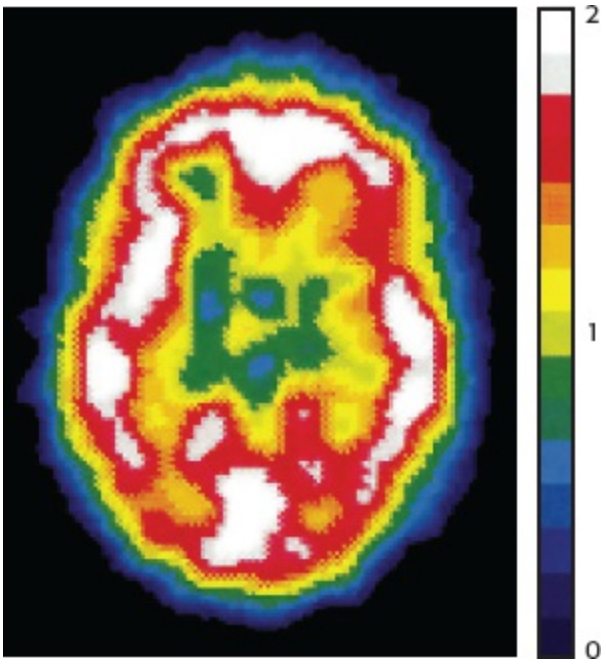


Figura 36.15 Alvos da clorpromazina. Esta imagem de tomografia por emissão de pósitrons mostra a distribuição dos receptores dopamínicos D2 no cérebro. As cores na barra à direita representam a distribuição relativa do receptor: as regiões brancas são as que apresentam a maior concentração; as regiões azul-escuras não têm receptores. Esses locais são bloqueados pelo tratamento com clorpromazina. [De C. Trichard *et al. Am. J. Psychiatry* 155:505-508, 1998; reimpressa com autorização enviada pelo Copyright Clearance Center, Inc.]

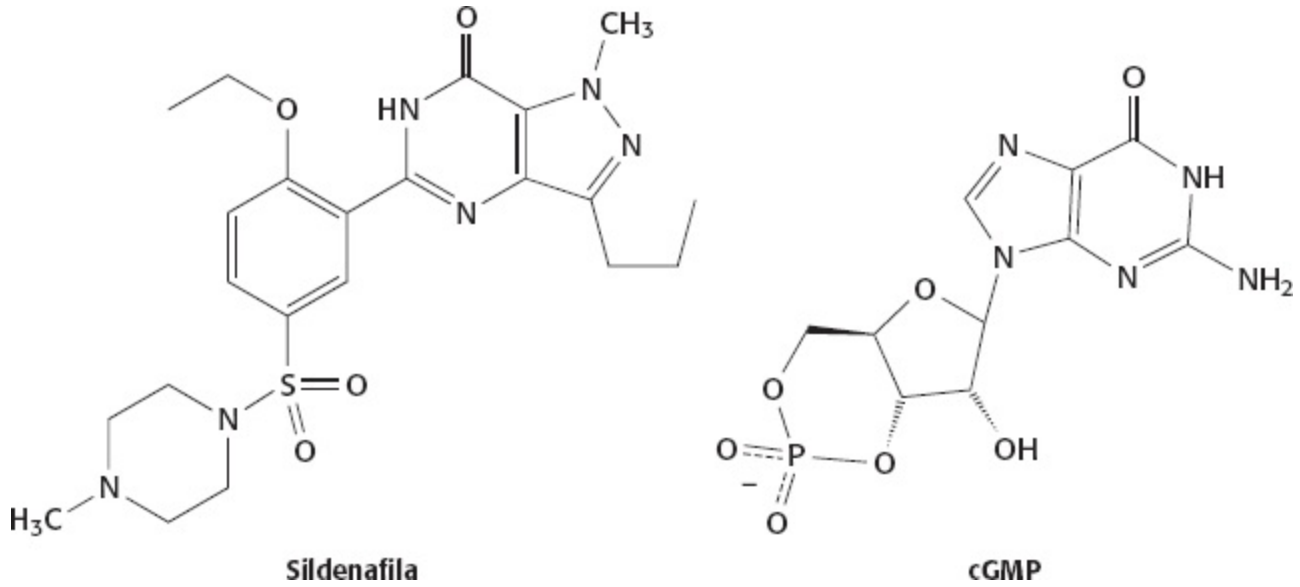


Figura 36.16 Sildenafila, um simulador de cGMP. A sildenafila foi planejada para se assemelhar ao cGMP, o substrato da fosfodiesterase 5.

Triagem de bibliotecas de compostos podem originar fármacos ou indícios para fármacos (*drug leads*)

Nenhum medicamento é tão amplamente usado como o ácido acetilsalicílico. Pelo menos desde o tempo de Hipócrates (cerca de 400 a.C.), pesquisadores têm registrado o uso de extratos da casca e das folhas do salgueiro para alívio da dor. Em 1829, uma mistura denominada *salicina* foi isolada da casca do salgueiro. A sua análise subsequente identificou o ácido salicílico como componente ativo da mistura. O ácido salicílico era antigamente utilizado para o tratamento da dor, porém esse composto frequentemente irritava o estômago. Vários pesquisadores tentaram encontrar um meio de neutralizar o ácido salicílico. Felix Hoffmann, um químico que trabalhava na companhia alemã Bayer, desenvolveu um derivado menos irritante ao tratar o ácido salicílico com uma base de cloreto de acetila. Esse derivado, o ácido acetilsalicílico, foi denominado *aspirina*, "a" do cloreto de acetila, "spir" de *Spirae ulmaria* (rainha-dos-prados ou ulmária, uma planta que produz flores e que também contém ácido salicílico) e "ina" (um sufixo comum para os medicamentos). A cada ano, aproximadamente 35.000 toneladas de ácido acetilsalicílico são tomadas no mundo inteiro, correspondendo a quase o peso do *Titanic*.

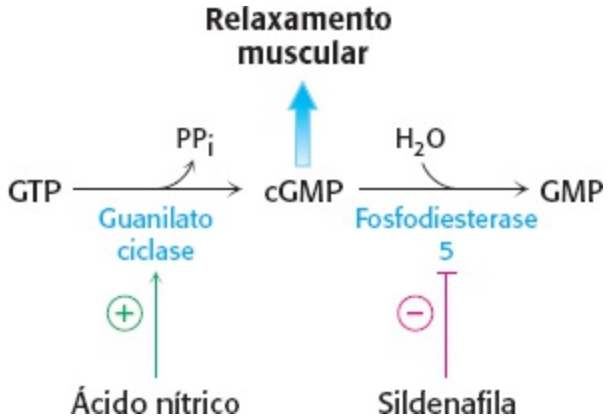
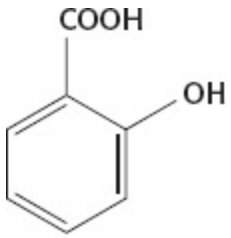
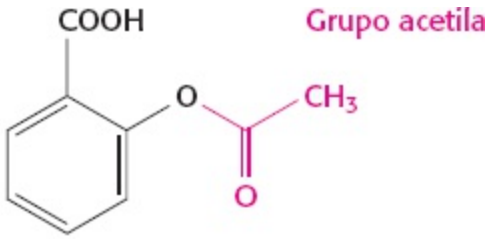


Figura 36.17 Via de relaxamento muscular. Aumentos nos níveis de óxido nítrico estimulam a guanilato ciclase, que produz cGMP. A concentração aumentada de cGMP promove relaxamento do músculo liso. A fosfodiesterase 5 hidrolisa o cGMP, com consequente diminuição de sua concentração. A inibição da fosfodiesterase 5 pela sildenafila mantém níveis

elevados de cGMP.



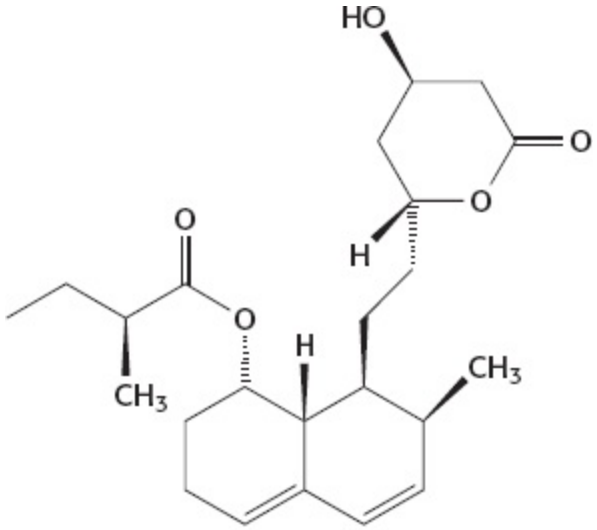
Ácido salicílico



Ácido acetilsalicílico (Aspirina®)

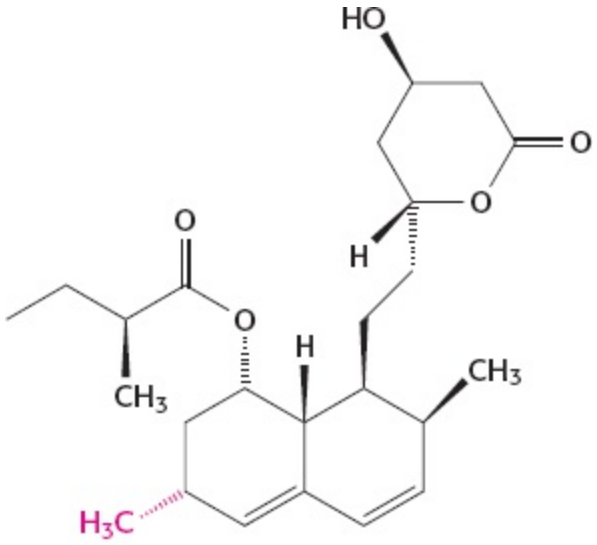
Conforme discutido no Capítulo 12, o grupo acetila do ácido acetilsalicílico é transferido para a cadeia lateral de um resíduo de serina localizado ao longo da via do sítio ativo do componente de ciclo-oxigenase da prostaglandina H_2 sintase (ver Figura 12.25). Nessa posição, o grupo acetila bloqueia o acesso ao sítio ativo. Por conseguinte, embora o ácido acetilsalicílico se ligue na mesma bolsa da enzima que o ácido salicílico, a acetila do ácido acetilsalicílico aumenta acentuadamente a sua eficiência como medicamento. Esse relato ilustra o valor da triagem de extratos obtidos de plantas e outros materiais que supostamente têm propriedades medicinais, à procura de compostos ativos. A grande quantidade de fitoterápicos e de remédios populares representa um grande tesouro de pistas para novos medicamentos.

Há mais de 100 anos, um material gorduroso amarelado foi descoberto nas paredes arteriais de pacientes que morriam de doença vascular. A presença do material foi denominada *ateroma*, da palavra grega que significa mingau. Foi constatado que esse material consistia em colesterol. O estudo cardíaco de Framingham, iniciado em 1948, documentou uma correlação entre os níveis elevados de colesterol no sangue e as altas taxas de mortalidade por doença cardíaca. Essa observação induziu a ideia de que o bloqueio da síntese de colesterol poderia reduzir os níveis sanguíneos de colesterol e, por sua vez, reduzir o risco de doença cardíaca. Os pesquisadores que desenvolvem fármacos tiveram que abandonar uma tentativa inicial de bloquear a via de síntese de colesterol em uma etapa avançada, devido à ocorrência de cataratas e outros efeitos colaterais, causados pelo acúmulo do substrato insolúvel da enzima inibida. Por fim, os pesquisadores identificaram um alvo mais favorável – isto é, a enzima HMG-CoA redutase (Seção 26.2). Essa enzima atua sobre um substrato, a HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A), que pode ser utilizado por outras vias e que é hidrossolúvel.



Compactina

Um produto natural promissor, a compactina, foi descoberto em uma triagem de compostos a partir de um caldo de fermentação de *Penicillium citrinum* em uma pesquisa de agentes antibacterianos. Em alguns estudos realizados em animais, foi constatado que a compactina inibe a HMG-CoA redutase e diminui os níveis séricos de colesterol. Em 1982, foi descoberto um novo inibidor da HMG-CoA redutase em um caldo de fermentação de *Aspergillus cereus*. Foi constatado que esse composto, agora denominado lovastatina, é estruturalmente muito semelhante à compactina, exibindo um grupo metila adicional.



Lovastatina

Nos estudos clínicos conduzidos, a lovastatina reduziu significativamente os níveis séricos de colesterol, com poucos efeitos colaterais. Foi possível evitar a maioria desses efeitos colaterais mediante tratamento com mevalonato (o produto da HMG-CoA redutase), indicando que esses efeitos fossem provavelmente devidos ao bloqueio altamente efetivo da HMG-CoA redutase. Um efeito colateral notável é a dor ou fraqueza muscular (denominada *miopatia*), embora a sua causa ainda não esteja totalmente estabelecida. Depois de muitos estudos, a *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA aprovou a lovastatina para tratamento dos níveis séricos elevados de colesterol.

Posteriormente, foi constatado que um inibidor estruturalmente relacionado da HMG-CoA redutase causa redução estatisticamente significativa nas taxas de mortalidade por coronariopatia. Esse

resultado validou os benefícios da redução dos níveis séricos de colesterol. Uma análise posterior ao nível de mecanismo revelou que o inibidor da HMG-CoA redutase atua não apenas reduzindo a taxa de biossíntese de colesterol, mas também induzindo a expressão do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Seção 26.3). As células que apresentam esses receptores removem as partículas de LDL da corrente sanguínea, de modo que essas partículas não podem contribuir para a formação de ateroma.

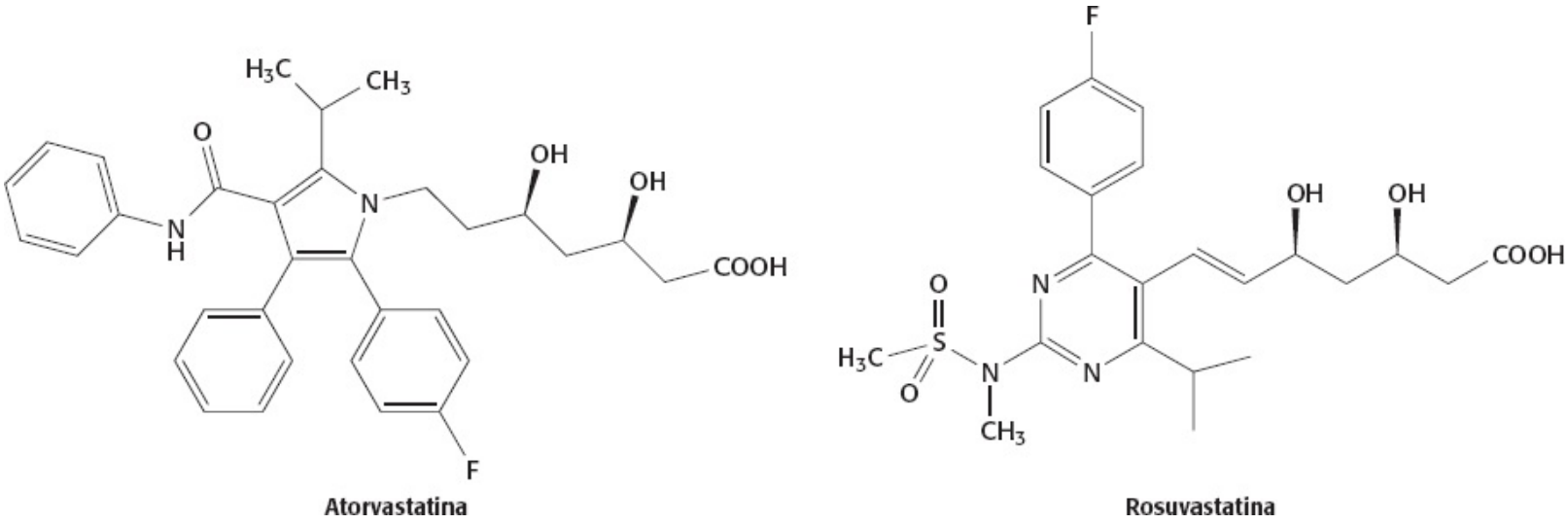


Figura 36.18 Estatinas sintéticas. A atorvastatina e a rosuvastatina são fármacos totalmente sintéticos que inibem a HMG-CoA redutase.

A lovastatina e seus familiares são produtos naturais ou compostos prontamente derivados de produtos naturais. A etapa seguinte foi o desenvolvimento de moléculas totalmente sintéticas que atuam como inibidores mais potentes da HMG-CoA redutase (Figura 36.18). Esses compostos são efetivos em doses mais baixas, reduzindo, assim, os efeitos colaterais.

Os inibidores originais da HMG-CoA redutase ou seus precursores foram encontrados por triagem de bibliotecas de produtos naturais. Mais recentemente, os pesquisadores que desenvolvem fármacos procuraram efetuar uma triagem de grandes bibliotecas de produtos naturais e de compostos totalmente sintéticos preparados no curso de muitos programas de desenvolvimento de fármacos. Em circunstâncias favoráveis, centenas de milhares ou até mesmo milhões de compostos podem ser testados nesse processo, denominado *triagem de alto rendimento*. Compostos nessas bibliotecas podem ser sintetizados um de cada vez para teste. Uma abordagem alternativa consiste em sintetizar uma grande quantidade de compostos estruturalmente relacionados, que diferem entre si em apenas uma ou algumas posições, todos de uma vez. Essa abordagem é frequentemente designada como *química combinatória*. Nessa abordagem, os compostos são sintetizados com o uso das mesmas reações químicas, porém com um conjunto variável de reagentes. Suponha que um esqueleto molecular seja construído com dois sítios reativos, e que 20 reagentes possam ser utilizados no primeiro sítio e 40 reagentes, no segundo. Pode-se produzir um total de $20 \times 40 = 800$ compostos possíveis.

Um método básico em química combinatória é a *síntese split-pool* (“dividir e misturar”) (Figura 36.19). Esse método depende de métodos sintéticos em fase sólida, inicialmente desenvolvidos para a síntese de peptídios (Seção 3.5). Os compostos são sintetizados em pequenas esferas. As esferas contendo um *arcabouço* inicial apropriado são produzidas e divididas (repartidas) em n conjuntos,

em que n corresponde à quantidade de blocos de construção a serem usados em um sítio. São efetuadas reações que acrescentam reagentes no primeiro sito, e as esferas são isoladas por filtração. Os n conjuntos de esferas são então combinados, misturados e novamente repartidos em m conjuntos, em que m corresponde à quantidade de reagentes a serem usados no segundo sítio. São efetuadas reações que acrescentam esses m reagentes, e as esferas são novamente isoladas. O resultado importante é que cada esfera contém apenas um composto, embora a biblioteca inteira de esferas contenha muitos deles. Além disso, embora apenas $n + m$ reações sejam efetuadas, são produzidos $n \times m$ compostos. Com os valores precedentes de n e m, $20 + 40 = 60$ reações produzem $20 \times 40 = 800$ compostos. Em alguns casos, os ensaios podem ser realizados diretamente com os compostos ainda fixados à esfera para encontrara compostos com propriedades desejadas (Figura 36.20). De modo alternativo, cada esfera pode ser isolada, e o composto pode ser clivado da esfera, produzindo compostos livres para análise. Uma vez identificado um composto interessante, é necessário utilizar métodos analíticos de vários tipos para identificar quais dos $n \times m$ compostos estão presentes.

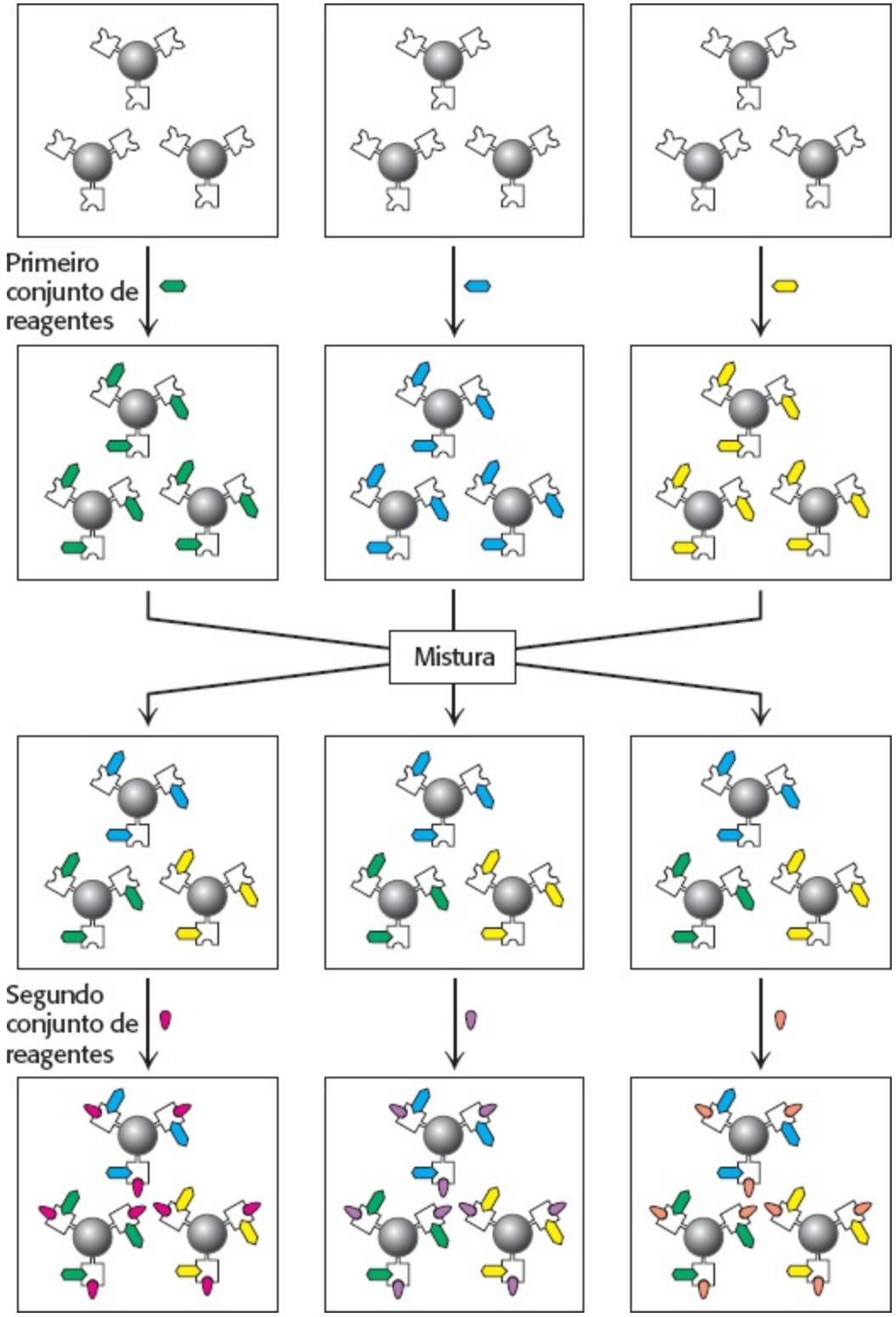


Figura 36.19 Síntese *split-pool* (dividir e misturar). São efetuadas reações em esferas. Cada uma das reações com o primeiro conjunto de reagentes ocorre em um conjunto separado de esferas. As esferas são então reunidas, misturadas e separadas em conjuntos. Acrescenta-se, então, o segundo conjunto de reagentes. Muitos compostos diferentes serão produzidos, porém todos eles em uma única esfera serão idênticos.

Observe que o "universo" de compostos semelhantes a fármacos é vasto. Segundo estimativas, são possíveis mais de 10^{40} compostos com pesos moleculares abaixo de 750. Por conseguinte, mesmo com "grandes" bibliotecas de milhões de compostos, apenas uma minúscula fração das possibilidades químicas está presente para estudo.

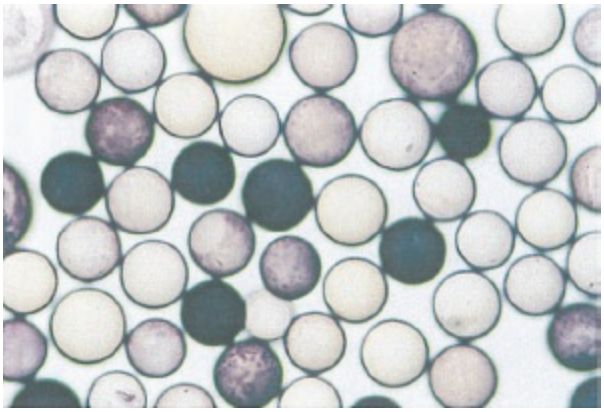


Figura 36.20 Triagem de uma biblioteca de carboidratos sintetizados. Uma pequena biblioteca combinatória de carboidratos sintetizados sobre a superfície de microesferas de 130 μm é submetida à triagem para carboidratos firmemente ligados por uma lectina de amendoim. As microesferas que apresentam esses carboidratos são intensamente coradas pela ação de uma enzima ligada à lectina. [De R. Liang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A. 94:10554-10559, 1997; © 2004 National Academy of Sciences, U.S.A.]

Podem-se planejar fármacos com base na informação da estrutura tridimensional de seus alvos

Muitos fármacos ligam-se a seus alvos lembrando o modelo de chave e fechadura de Emil Fischer (ver Figura 8.8). Por conseguinte, devemos ser capazes de planejar uma chave, tendo como base um conhecimento suficiente acerca do formato e da composição química da fechadura. No caso ideal, gostaríamos de planejar uma pequena molécula que fosse complementar, no seu formato e estrutura eletrônica, a uma proteína-alvo, possibilitando a sua ligação efetiva ao sítio-alvo. Apesar de nossa capacidade de determinar rapidamente estruturas tridimensionais, a realização desse objetivo permanece para o futuro. É complicado planejar, a partir do zero, compostos estáveis que tenham o formato correto e outras propriedades para encaixar-se precisamente em um sítio de ligação, devido à dificuldade em prever a estrutura que irá corresponder melhor a um sítio de ligação. A previsão da afinidade de ligação requer uma compreensão detalhada das interações entre um composto e seu parceiro de ligação *e* das interações entre o composto e o solvente, quando o composto estiver livre em solução.

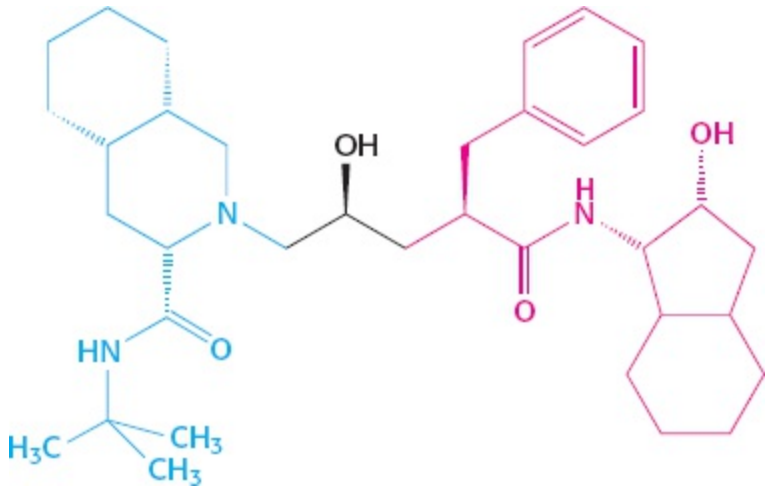
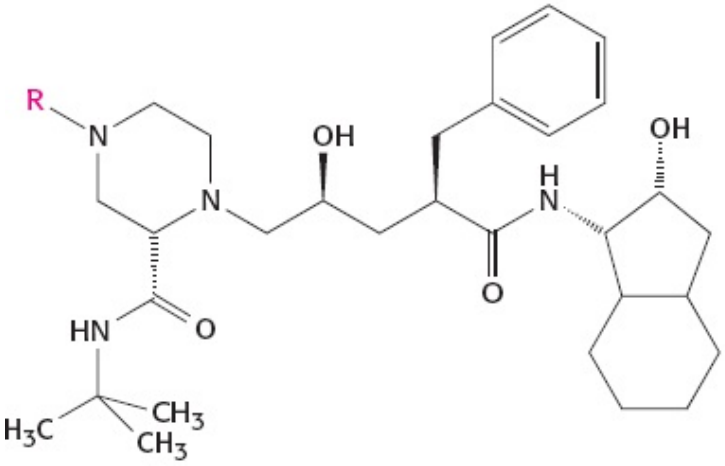


Figura 36.21 Planejamento inicial de um inibidor da protease do HIV. Esse composto foi planejado pela combinação de parte de um composto com boa atividade de inibição, mas com pouca solubilidade (mostrado em vermelho), com parte de outro composto exibindo melhor solubilidade (mostrado em azul).

Entretanto, o *planejamento de fármacos com base na estrutura* provou ser uma poderosa ferramenta no desenvolvimento de fármacos. Entre os sucessos mais proeminentes, está o desenvolvimento de medicamentos que inibem a protease do vírus HIV. Consideremos o desenvolvimento do inibidor da protease, o indinavir. Foram descobertos dois conjuntos de inibidores promissores, que apresentavam alta potência, porém pouca solubilidade e biodisponibilidade. As análises de cristalografia de raios X e os achados de modelagem molecular sugeriram que uma molécula híbrida poderia ter alta potência, bem como melhor biodisponibilidade (Figura 36.21). O composto híbrido sintetizado mostrou aprimoramento, porém ainda precisou ser otimizado. Os dados estruturais sugeriram um ponto em que as modificações poderiam ser toleradas. Uma série de compostos foi produzida e examinados (Figura 36.22). O composto mais ativo exibiu baixa biodisponibilidade, porém um dos outros compostos teve boa biodisponibilidade e atividade aceitável. A concentração sérica máxima disponível por administração oral foi significativamente mais alta do que os níveis necessários para suprimir a replicação do vírus. Esse fármaco, bem como outros inibidores da protease desenvolvidos quase ao mesmo tempo, tem sido utilizado em combinação com outros medicamentos para tratamento da AIDS, com resultados muito mais encorajadores do que aqueles obtidos anteriormente (Figura 36.23).



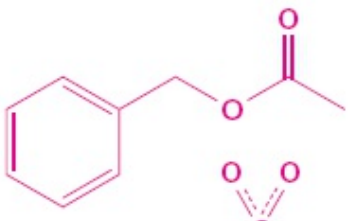
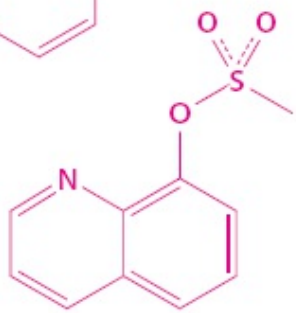
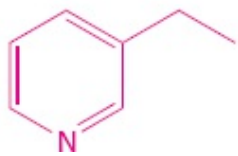
R =	IC_{50} (nmol)	log(*P*)	$c_{máx.}$ (μM)
	0,4	4,67	< 0,1
	0,01	3,70	< 0,1
	0,3	3,69	0,7
	0,6	2,92	11

Figura 36.22 Otimização de compostos. Quatro compostos são avaliados quanto às suas características, incluindo IC_{50}, log(*P*) e $C_{máx.}$ (a concentração máxima do composto presente), medidos no soro de cães. O composto mostrado na parte inferior é o que apresenta poder inibitório mais fraco (medido pelo IC_{50}), porém melhor biodisponibilidade (medida pela $C_{máx.}$). Esse composto foi selecionado para ser posteriormente desenvolvido, o que levou ao surgimento do fármaco indinavir.

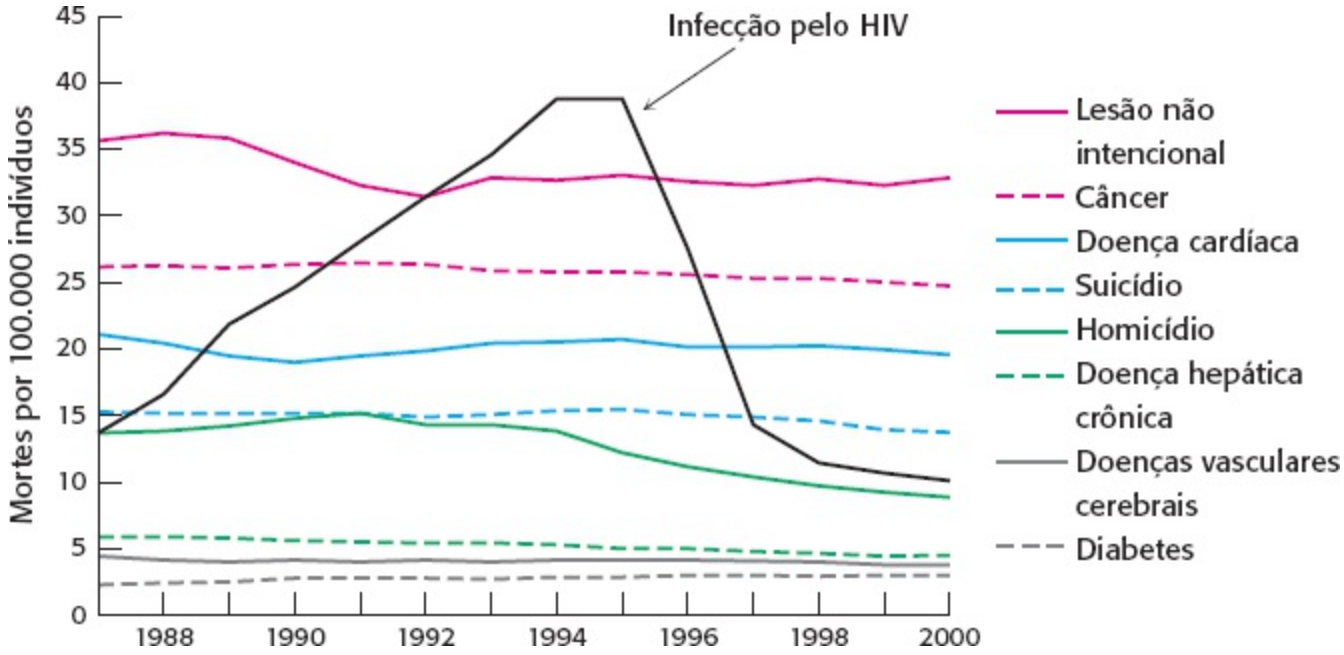


Figura 36.23 Efeito do desenvolvimento de fármacos anti-HIV. As taxas de mortalidade da infecção pelo HIV (AIDS) revelam o forte efeito dos inibidores da protease do HIV e o seu uso em associação a inibidores da transcriptase reversa do HIV. As taxas de mortalidade nesse gráfico foram obtidas das principais causas de morte de indivíduos entre 24 e 44 anos de idade nos EUA. [De Centers for Disease Control.]

O ácido acetilsalicílico tem como alvo o sítio da ciclo-oxigenase na prostaglandina H_2 sintase, conforme discutido anteriormente. Estudos realizados em animais sugeriram que os mamíferos contêm não apenas uma, mas duas ciclo-oxigenases distintas, ambas atuando como alvo do ácido acetilsalicílico. A enzima mais recentemente descoberta, a ciclo-oxigenase 2 (COX2), é expressa principalmente como parte da resposta inflamatória, enquanto a expressão da ciclo-oxigenase 1 (COX1) é mais generalizada. Essas observações sugeriram que um inibidor da ciclo-oxigenase específico para a COX2 poderia ser capaz de reduzir a inflamação em condições como a artrite, sem produzir os efeitos gástricos e outros efeitos colaterais associados ao ácido acetilsalicílico.

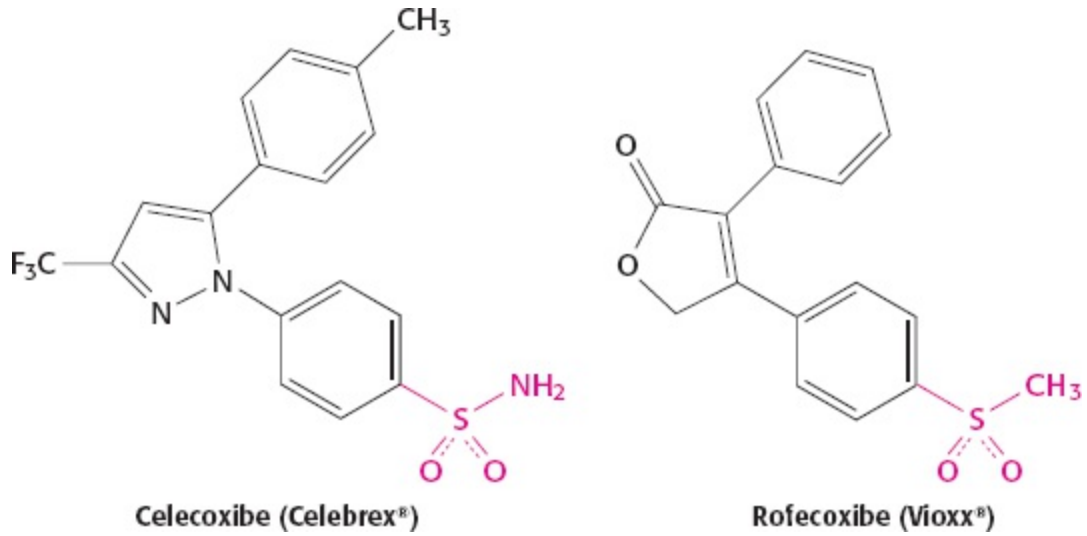


Figura 36.24 Inibidores específicos da COX2. Esses compostos exibem protuberâncias (mostradas em vermelho) que se adaptam a uma bolsa na isoenzima COX2, mas que colidem estericamente com a isoenzima COX1.

As sequências de aminoácidos da COX1 e da COX2 foram deduzidas a partir de estudos de clonagem de cDNA. Essas sequências são mais de 60% idênticas, indicando claramente que as

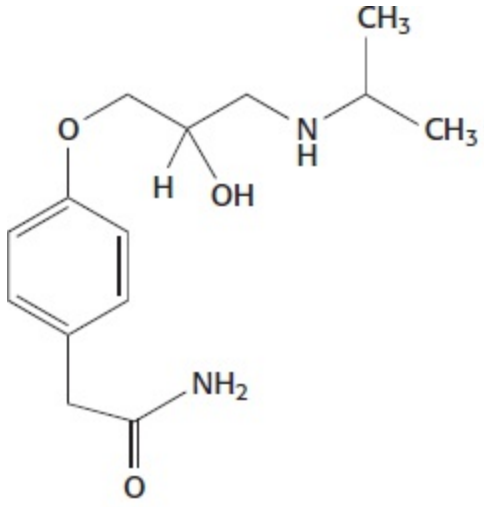
enzimas apresentam a mesma estrutura global. Entretanto, existem algumas diferenças nos resíduos em torno do sítio de ligação do ácido acetilsalicílico. A cristalografia de raios X revelou a presença de uma extensão da bolsa de ligação na COX2, que está ausente na COX1. Essa diferença estrutural sugeriu uma estratégia para o desenvolvimento de inibidores específicos da COX2 – isto é, sintetizar compostos que tivessem uma protuberância para se encaixar na bolsa existente na enzima COX2. Esses compostos foram planejados e sintetizados e, a seguir, aprimorados ainda mais para produzir fármacos efetivos como Celebrex® e Vioxx® (Figura 36.24). Mais tarde, o Vioxx® foi retirado do mercado, visto que algumas pessoas tiveram efeitos adversos. Esses efeitos parecem representar a consequência da inibição da COX2, o alvo pretendido. Por conseguinte, embora o desenvolvimento desses medicamentos represente um triunfo para o planejamento de fármacos com base na estrutura, esses resultados ressaltam o fato de que a inibição de enzimas importantes pode levar a respostas fisiológicas complexas.

36.3 As análises dos genomas são promissoras para a descoberta de fármacos

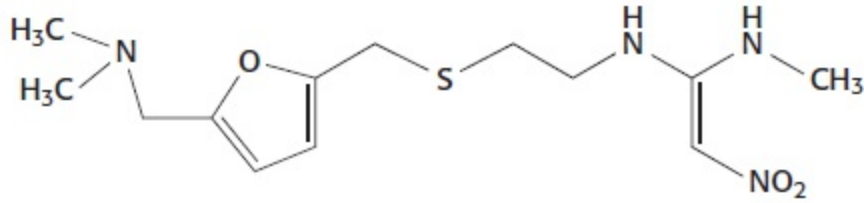
O término do sequenciamento do genoma humano e de outros genomas constitui uma força propulsora potencialmente poderosa para o desenvolvimento de novos fármacos. Os projetos de sequenciamento e análise de genomas ampliaram enormemente nossos conhecimentos acerca das proteínas codificadas pelo genoma humano. Essa nova fonte de conhecimento pode acelerar acentuadamente as etapas iniciais no processo de desenvolvimento de fármacos ou até mesmo possibilitar a individualização de fármacos para cada paciente.

Alvos potenciais podem ser identificados no proteoma humano

O genoma humano codifica aproximadamente 25.000 proteínas, sem contar as variações produzidas por *splicing* alternativo do mRNA e modificações pós-traducionais. Muitas dessas proteínas são alvos potenciais de fármacos, em particular as que são enzimas ou receptores e que exercem efeitos biológicos significativos quando ativadas ou inibidas. Várias grandes famílias de proteínas constituem fontes particularmente ricas de alvos. Por exemplo, o genoma humano inclui genes para mais de 500 proteína quinases, que podem ser reconhecidas pela comparação das sequências deduzidas de aminoácidos. Muitas dessas proteína quinases são conhecidas por desempenharem um papel na progressão de uma variedade de doenças. Por exemplo, a Bcr-Abl quinase, uma quinase desregulada formada em decorrência de um defeito cromossômico específico, é conhecida pela sua contribuição em certas leucemias e constituiu o alvo do fármaco mesilato de imatinibe (Seção 14.5). Algumas das outras proteína quinases sem dúvida alguma também desempenham papéis fundamentais em determinados tipos de câncer. De modo semelhante, o genoma humano codifica aproximadamente 800 receptores 7TM (Seção 14.1) dos quais cerca de 350 são receptores odorantes. Muitos dos receptores 7TM remanescentes constituem alvos potenciais de medicamentos. Alguns deles já são alvos de fármacos, como o betabloqueador atenolol, cujo alvo é o receptor beta-adrenérgico, e o medicamento antiulceroso, a ranitidina. Este último composto é um antagonista do receptor histamínico H_2, um receptor 7TM que participa do controle da secreção de ácido gástrico.



Atenolol

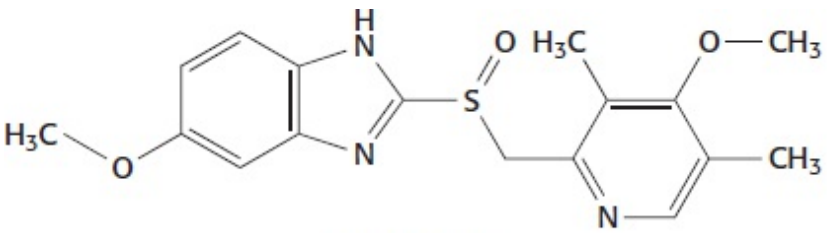


Ranitidina

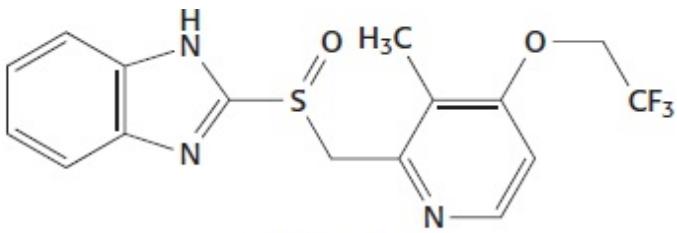
Novas proteínas que não constituem parte de grandes famílias que já fornecem alvos para fármacos podem ser mais facilmente identificadas com o uso da informação genômica. Existem diversas maneiras de identificar proteínas passíveis de atuar como alvos para programas de desenvolvimento de fármacos. Um dos métodos é procurar mudanças em padrões de expressão, localização de proteínas ou modificações pós-traducionais em células de organismos acometidos de doença. Outra maneira consiste em conduzir estudos de tecidos ou de tipos de células nos quais são expressos genes específicos. A análise do genoma humano aumentaria a quantidade de alvos ativamente investigados para fármacos em um fator estimado em dois ou mais.

Modelos animais podem ser desenvolvidos para testar a validade de alvos potenciais de fármacos

Os genomas de diversos organismos-modelo já estão sequenciados. O mais importante desses genomas para o desenvolvimento de fármacos é o do camundongo. De modo notável, os genomas do camundongo e do homem têm sequências aproximadamente 85% idênticas, e mais de 98% de todos os genes humanos apresentam correspondentes reconhecíveis no camundongo. Os estudos em camundongos forneceram aos pesquisadores que desenvolvem fármaco uma poderosa ferramenta – a capacidade de destruir (*knock out*) genes específicos no camundongo (p 166). Se a destruição de um gene tiver algum efeito desejável, então o produto desse gene representa um alvo promissor de fármaco. A utilidade dessa abordagem foi demonstrada de modo retrospectivo. Por exemplo, a destruição do gene para a subunidade α da H^+-K^+ ATPase, a proteína-chave para a secreção de ácido no estômago, produz camundongos com menos ácido em seus estômagos. O pH do estômago desses animais é de 6,9 em circunstancias que produzem um pH gástrico de 3,2 em seus correspondentes de tipo selvagem. Essa proteína constitui o alvo dos fármacos omeprazol e lansoprazol, que são utilizados no tratamento da doença por refluxo gastresofágico.



Omeprazol



Lansoprazol

Muitos esforços estão sendo envidados para produzir centenas ou milhares de linhagens de cepas de camundongos, tendo, cada uma delas, um gene destruído. Os fenótipos desses animais fornecem uma boa indicação de que a proteína codificada por um gene destruído constitui um alvo promissor de fármaco. Com essa abordagem, os pesquisadores que desenvolvem fármacos podem avaliar alvos potenciais, sem quaisquer noções preconcebidas em relação à função fisiológica.

Podem ser identificados alvos potenciais nos genomas de patógenos.

As proteínas humanas não são os únicos alvos importantes de fármacos. Medicamentos como a penicilina e os inibidores da protease do HIV atuam sobre proteínas-alvo dentro de um patógeno. Os genomas de centenas de patógenos já estão sequenciados, e essas sequências podem ser exploradas à procura de alvos potenciais.

São necessários novos antibióticos para combater bactérias resistentes a muitos dos antibióticos resistentes. Uma abordagem consiste em procurar proteínas essenciais à sobrevivência da célula que estejam conservadas em uma ampla variedade de bactérias. Espera-se que os fármacos capazes de inativar essas proteínas sejam antibióticos de amplo espectro, úteis para tratar infecções causadas por uma ampla gama de bactérias diferentes. Uma dessas proteínas é a peptídio desformilase, a enzima que remove grupos formila presentes nas extremidades aminoterminais das proteínas bacterianas imediatamente após a tradução (ver Figura 30.19).

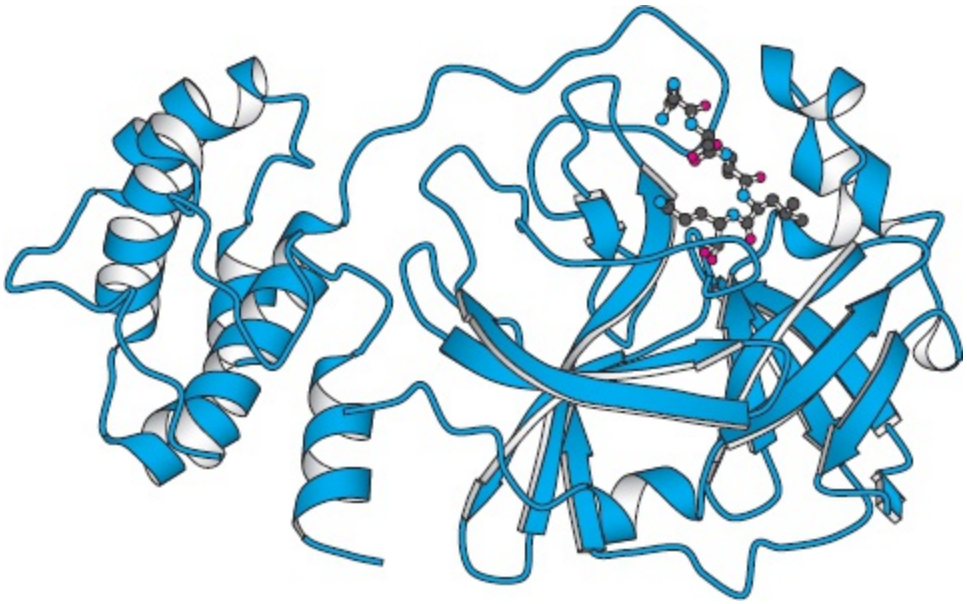


Figura 36.25 Alvo emergente de fármaco. A estrutura de uma protease do coronavírus que causa a SARS é mostrada ligada a um inibidor. Essa estrutura foi determinada menos de 1 ano após a identificação do vírus. [Desenhada a partir de 1P9S.bdb.]

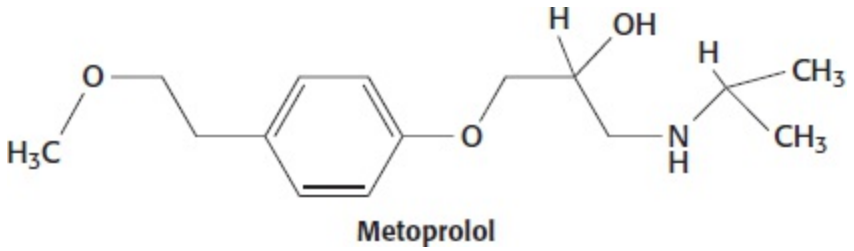
De modo alternativo, pode ser necessário dispor de um fármaco contra um patógeno específico. Um exemplo recente desse tipo de patógeno é o microrganismo responsável pela síndrome respiratória aguda grave (SARS, do inglês *severe acute respiratory syndrome*). Dentro de 1 mês após o reconhecimento dessa doença emergente, os pesquisadores isolaram o vírus que causa a síndrome, e, em poucas semanas, foi efetuado o sequenciamento completo de seu genoma de 29.751 bases. Essa sequência revelou a presença de um gene que codifica uma protease viral, conhecida por ser essencial na replicação de vírus a partir de estudos de outros membros da família dos coronavírus à qual pertence o vírus da SARS. Os pesquisadores que desenvolvem fármacos já estão

trabalhando à procura de inibidores específicos dessa protease (Figura 36.25).

As respostas individuais aos medicamentos são influenciadas por diferenças genéticas

Muitos medicamentos não são efetivos em todas as pessoas, geralmente por causa das diferenças genéticas entre elas. Os indivíduos que não respondem podem apresentar diferenças discretas na molécula-alvo do medicamento ou nas proteínas que atuam no transporte e no metabolismo do medicamento. A meta dos campos emergentes da farmacogenética e da farmacogenômica é planejar medicamentos capazes de atuar mais consistentemente entre as pessoas ou que sejam individualizados para pessoas com genótipos particulares.

Os fármacos como o metoprolol, cujo alvo é o receptor β_1-adrenérgico, constituem tratamentos populares para a hipertensão. Esses fármacos são frequentemente designados como "betabloqueadores".



Metoprolol

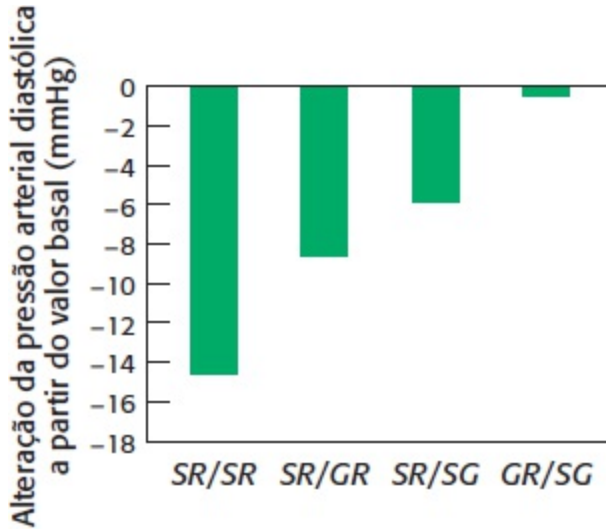
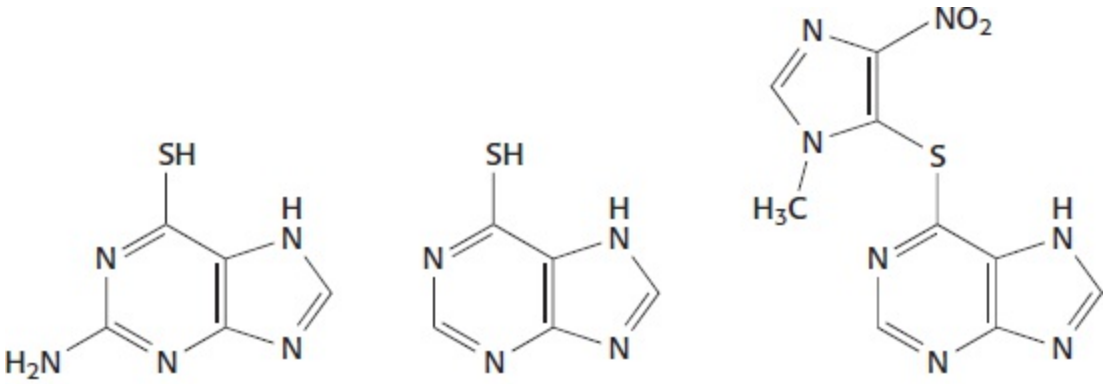


Figura 36.26 Correlação fenótipo-genótipo. Alterações médias da pressão arterial diastólica durante o tratamento com metoprolol. Os indivíduos com duas cópias do alelo mais comum ($S_{49}R_{389}$) apresentaram reduções significativas da pressão arterial. Os indivíduos com um alelo variante (*GR* ou *SG*) exibiram diminuições mais modestas, e aqueles com dois alelos variantes (*GR*/*SG*) não tiveram nenhuma redução. [De J. A. Johnson *et al., Clin. Pharmacol. Ther.* 74:44-52, 2003.]

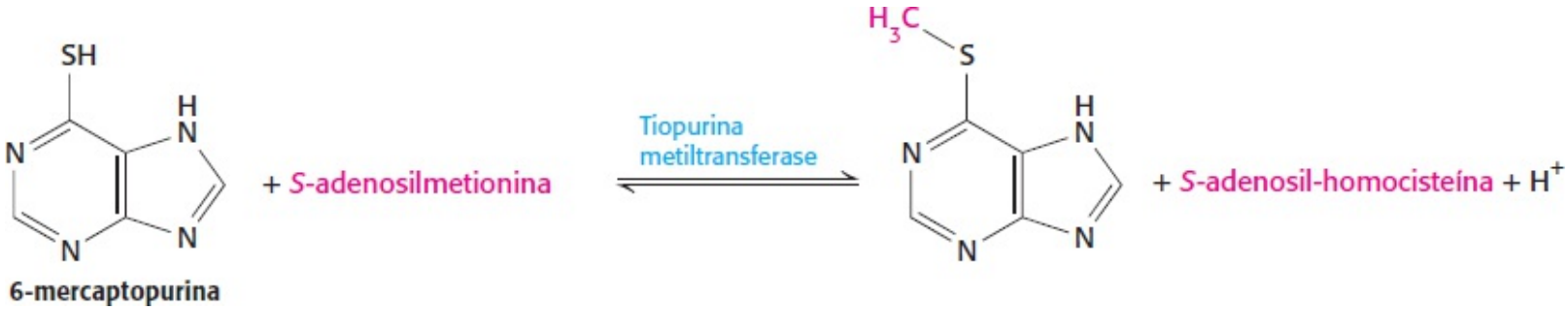
Todavia, alguns indivíduos não respondem de modo satisfatório. Na população dos EUA, é comum a ocorrência de duas variantes do gene que codifica o receptor β_1-adrenérgico. O alelo mais comum tem serina na posição 49 e arginina na posição 389. Todavia, em alguns indivíduos, a glicina substitui um ou outro desses resíduos. Nos estudos realizados, os participantes com duas cópias do alelo mais comum responderam de modo satisfatório ao metoprolol: sua pressão arterial diastólica durante o dia foi reduzida em 14,7 + 2,9 mmHg em média. Em contrapartida, os participantes com um alelo variante exibiram menor redução da pressão arterial, e o medicamento não teve efeito significativo nos participantes com dois alelos variantes (Figura 36.26). Essas observações sugerem

a utilidade de determinar o genótipo dos indivíduos nessas posições. Em seguida, seria possível prever se o tratamento com metoprolol ou com outros betabloqueadores tem probabilidade de ser ou não efetivo.

Tendo em vista a importância das propriedades de ADME e de toxicidade na determinação da eficácia dos fármacos, não é surpreendente que variações nas proteínas que atuam no transporte e no metabolismo dos fármacos possam alterar a sua eficiência. Um exemplo importante é o uso das tiopurinas, como a 6-tioguanina, a 6-mercaptopurina e a azatioprina, no tratamento de doenças como a leucemia, os distúrbios imunes e a doença inflamatória intestinal.



Em uma minoria de pacientes que são tratados com esses medicamentos, surgem sinais de toxicidade com doses que são bem toleradas pela maioria dos pacientes. Essas diferenças entre pacientes devem-se a variações raras no gene que codifica a enzima envolvida no metabolismo de xenobióticos, a tiopurina metiltransferase, que adiciona um grupo metila a átomos de enxofre.



A enzima variante é menos estável. Os pacientes com essas enzimas variantes podem desenvolver níveis tóxicos desses medicamentos se não forem tomados cuidados apropriados. Por conseguinte, a variabilidade genética em uma enzima que atua no metabolismo de fármacos desempenha um importante papel na determinação da variação na tolerância de diferentes indivíduos a determinados níveis de medicamentos. Muitas outras enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos e proteínas de transporte de fármacos foram implicadas no controle de reações individuais a medicamentos específicos. A identificação dos fatores genéticos nos ajuda e entender melhor por que alguns medicamentos atuam bem em alguns indivíduos, mas não em outros. No futuro, os médicos poderão examinar os genes de um paciente para ajudar no planejamento de programas de terapia farmacológica.

36.4 O desenvolvimento de fármacos ocorre em vários estágios

Nos EUA, a FDA exige a demonstração de que os candidatos a fármacos sejam efetivos e seguros antes que possam ser utilizados em larga escala nos seres humanos. Essa exigência aplica-se particularmente aos candidatos a fármacos que são tomados por indivíduos relativamente saudáveis. Um maior número de efeitos colaterais é aceitável para candidatos cujo objetivo é tratar pacientes muito doentes, como os que apresentam formas graves de câncer, que podem sofrer consequências adversas claras se não receberem um tratamento efetivo.

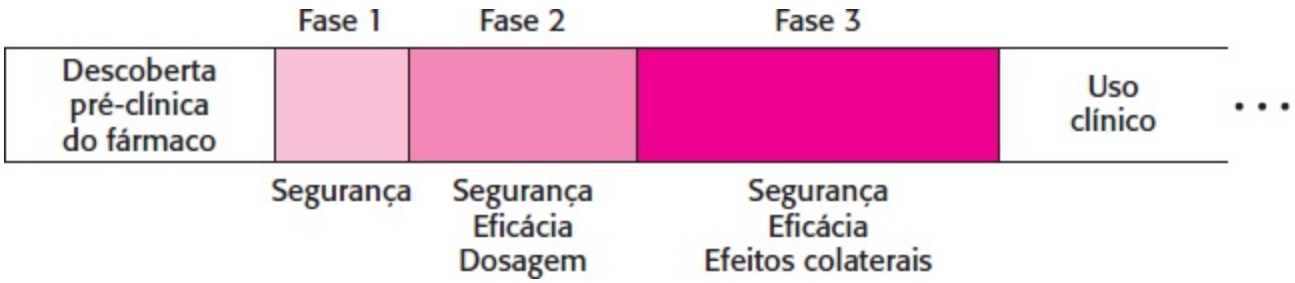


Figura 36.27 Fases dos ensaios clínicos. Os ensaios clínicos são conduzidos em fases que examinam a segurança e a eficácia em grupos de indivíduos cada vez maiores.

Os ensaios clínicos são demorados e de elevado custo

Os ensaios clínicos testam a eficiência e os efeitos colaterais potenciais de um candidato a fármaco antes de sua aprovação pela FDA para uso geral. Esses estudos clínicos ocorrem em pelo menos três fases (Figura 36.27). Na fase 1, um pequeno número (habitualmente 10 a 100) de voluntários saudáveis toma o medicamento para um estudo inicial de segurança. Esses voluntários recebem uma variedade de doses e são monitorados à procura de sinais de toxicidade. A eficácia do fármaco candidato não é avaliada especificamente.

Na fase 2, a eficácia do candidato a fármaco é testada em um pequeno número de indivíduos que poderiam se beneficiar do medicamento. São obtidos mais dados acerca da segurança do medicamento. Esses ensaios clínicos são, frequentemente, controlados e duplos-cegos. Em um estudo controlado, os indivíduos são divididos aleatoriamente em dois grupos. Os indivíduos no grupo de tratamento recebem o tratamento sob investigação. Os indivíduos no grupo de controle recebem um placebo – isto é, um tratamento, como pílulas de açúcar, conhecido por não ter valor intrínseco – ou o melhor tratamento padrão disponível, se a suspensão do tratamento não for ética. Em um estudo duplo-cego, nem os indivíduos nem os pesquisadores sabem quais os indivíduos que estão no grupo do tratamento e quais estão no grupo de controle. O estudo duplo-cego evita a tendenciosidade durante o ensaio clínico. Uma vez concluído o estudo clínico, a distribuição dos indivíduos nos grupos de tratamento e controle é revelada, e os resultados nos dois grupos são comparados. Com frequência, são investigadas diversas doses nos estudos clínicos de fase 2 para determinar aquelas que parecem estar livres de efeitos colaterais graves e aquelas que parecem ser efetivas.

Não se deve subestimar o poder do efeito placebo – isto é, a tendência a perceber uma melhora em um indivíduo que acredita estar recebendo um tratamento potencialmente benéfico. Por exemplo, em um estudo de tratamento cirúrgico artroscópico para dor de joelho, os indivíduos que foram levados a acreditar que se submeteram a cirurgia por meio do uso de videoteipes e outros meios apresentaram, em média, o mesmo nível de melhora do que indivíduos que realmente foram operados.

Na fase 3, são efetuados estudos semelhantes com uma população maior de indivíduos. Essa fase

tem por objetivo estabelecer mais firmemente a eficácia do candidato a fármaco e detectar efeitos colaterais que podem surgir em uma pequena porcentagem dos indivíduos que recebem o tratamento. Milhares de indivíduos podem participar em um estudo típico de fase 3.

Os estudos clínicos podem ser extremamente dispendiosos. Centenas ou milhares de pacientes devem ser recrutados e monitorados durante toda a duração do estudo. Muitos médicos, enfermeiros, farmacologistas clínicos, estatísticos e outros participam no planejamento e na execução do estudo clínico. Os custos podem atingir dezenas a centenas de milhões de dólares. Registros extensos precisam ser mantidos, incluindo a documentação de quaisquer reações adversas. Esses dados são compilados e submetidos à FDA. O custo total para o desenvolvimento de um fármaco é atualmente estimado em 400 a 800 milhões de dólares.

Mesmo depois da aprovação e do uso de um medicamento, podem surgir dificuldades. Conforme assinalado anteriormente, o rofecoxibe, por exemplo, foi retirado do mercado após a detecção de efeitos colaterais cardíacos significativos em estudos clínicos adicionais. Esses eventos ressaltam a necessidade dos usuários de qualquer medicamento de contrabalançar os efeitos benéficos com os riscos potenciais.

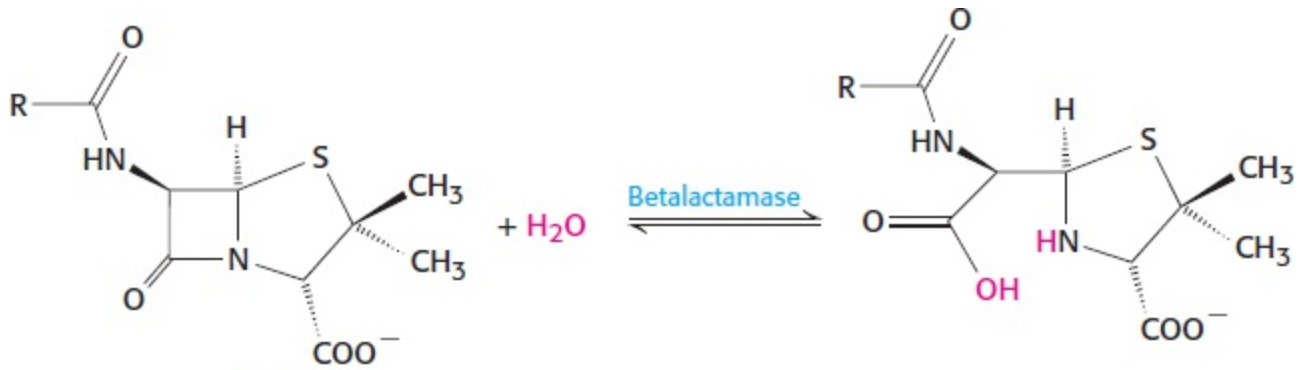
A evolução da resistência a fármacos pode limitar a sua utilidade contra agentes infecciosos e contra o câncer

Muitos medicamentos são utilizados por longos períodos, sem qualquer perda de sua eficiência. Todavia, em alguns casos, particularmente para o tratamento do câncer ou de doença infecciosa, os tratamentos farmacológicos inicialmente efetivos tornam-se menos eficazes. Em, outras palavras, a doença torna-se resistente à terapia farmacológica. Por que surge essa resistência? As doenças infecciosas e o câncer apresentam uma característica em comum – a saber, um indivíduo afetado contém muitas células (ou vírus) que podem mutar e se reproduzir. Essas condições são necessárias para que ocorra evolução. Por conseguinte, um microrganismo ou uma célula cancerosa pode, por acaso, sofrer uma variação genética, tornando-se mais apropriado para o crescimento e a reprodução na presença do medicamento do que a população de microrganismos ou de células cancerosas como um todo. Esses microrganismos ou essas células são mais aptos do que outros em sua população e, portanto, tendem a sobrepujar essa população. Como a pressão seletiva devida ao medicamento é continuamente aplicada, a população de microrganismos ou de células cancerosas tenderá a se tornar cada vez mais resistente à presença do medicamento. Convém assinalar que a resistência pode surgir por meio de diversos mecanismos.

Os inibidores da protease do HIV discutidos anteriormente são bons exemplos da evolução da resistência a fármacos. Os retrovírus estão muito bem adaptados a esse tipo de evolução, visto que a transcriptase reversa efetua a replicação sem um mecanismo de revisão. Em um genoma de aproximadamente 9.750 bases, estima-se que cada mutação pontual única possível apareça em uma partícula viral mais de 1.000 vezes/dia em cada indivíduo infectado. Ocorrem também numerosas mutações múltiplas. A maioria dessas mutações não tem nenhum efeito ou é deletéria para o vírus. Todavia, algumas das partículas virais mutantes codificam proteases que são menos suscetíveis à inibição pelo medicamento. Na presença de um inibidor da protease do HIV, essas partículas virais tendem a se replicar mais efetivamente do que a população como um todo. Com o passar do tempo, os vírus menos suscetíveis dominam a população, e esta se torna resistente ao medicamento.

Os patógenos podem tornar-se resistentes aos antibióticos por mecanismos totalmente diferentes.

Alguns patógenos contêm enzimas que inativam ou que degradam antibióticos específicos. Por exemplo, muitos microrganismos são resistentes aos betalactâmicos, como a penicilina, visto que eles contêm betalactamases. Essas enzimas hidrolisam o anel betalactâmico, tornando os medicamentos inativos.



Penicilina

Muitas dessas enzimas são codificadas em plasmídios, que consistem em pequenos segmentos circulares de DNA frequentemente transportados por bactérias. Muitos plasmídios são facilmente transferidos de uma célula bacteriana para outra, transmitindo, assim, a capacidade de resistência ao antibiótico. Por conseguinte, a transferência de plasmídios contribui para a propagação da resistência ao antibiótico, representando um grande desafio na assistência à saúde. Por outro lado, os plasmídios têm sido aproveitados para uso em métodos de DNA recombinante (Seção 5.2).

Em geral, a resistência a medicamentos surge no curso do tratamento do câncer. As células cancerosas caracterizam-se pela sua capacidade de crescimento rápido, sem as restrições que se aplicam às células normais. Muitos fármacos utilizados na quimioterapia do câncer inibem processos que são necessários para esse rápido crescimento celular. Entretanto, as células cancerosas individuais podem acumular alterações genéticas que reduzem os efeitos desses medicamentos. Essas células cancerosas alteradas tendem a crescer mais rapidamente do que as outras e passam a ser dominantes na população de células cancerosas. Essa capacidade das células cancerosas de mutarem rapidamente tem sido um desafio para um dos principais avanços no tratamento do câncer: o desenvolvimento de inibidores de proteínas específicas das células cancerosas presentes em certas leucemias (Seção 14.5). Por exemplo, os tumores tornam-se indetectáveis em pacientes tratados com mesilato de imatinibe, que é direcionado contra a proteína quinase Bcr-Abl. Infelizmente, os tumores de muitos pacientes tratados com mesilato de imatinibe sofrem recorrência depois de um período de vários anos. Em muitos desses casos, as mutações alteram a proteína Bcr-Abl, de modo que ela não é mais inibida pelas concentrações de mesilato de imatinibe usadas no tratamento.

Com frequência, os pacientes com câncer fazem uso concomitante de múltiplos medicamentos no curso da quimioterapia, e, em muitos casos, as células cancerosas tornam-se simultaneamente resistentes a muitos deles ou a todos eles. Essa resistência a múltiplos fármacos pode resultar da proliferação de células cancerosas que hiperexpressam várias das proteínas transportadoras ABC que bombeiam fármacos para fora da célula (Seção 13.2). Por conseguinte, as células cancerosas podem desenvolver resistência aos fármacos pela hiperexpressão de proteínas humanas normais ou pela modificação de proteínas responsáveis pelo fenótipo do câncer.

Resumo

36.1 O desenvolvimento de fármacos é um imenso desafio

A maioria dos fármacos atua pela sua ligação a enzimas ou a receptores, modulando as suas atividades. Para serem efetivos, os medicamentos devem ligar-se a esses alvos com alta afinidade e especificidade. Todavia, até mesmo a maioria dos compostos com afinidade e especificidade desejadas não constitui fármacos apropriados. A maior parte dos compostos é pouco absorvida ou rapidamente excretada do organismo, ou modificada por vias metabólicas direcionadas para compostos exógenos. Em consequência, quando tomados por via oral, esses compostos não alcançam os seus alvos em concentrações apropriadas por um período de tempo suficiente. As propriedades de um fármaco relacionadas com a sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção são designadas como propriedades ADME. A biodisponibilidade oral é uma medida da capacidade de absorção de um fármaco; trata-se da razão entre a concentração máxima de um composto administrado por via oral e a concentração máxima da mesma dose injetada diretamente. A estrutura de um composto pode afetar de modo complicado a sua biodisponibilidade, porém generalizações denominadas regras de Lipinski fornecem diretrizes úteis. As vias de metabolismo dos fármacos incluem a oxidação por enzimas do citocromo P450 (metabolismo de fase I) e conjugação com glutationa, ácido glicurônico e sulfato (metabolismo de fase II). Um composto também pode não ser um medicamento útil, visto que é tóxico, modula a molécula-alvo com excessiva efetividade ou liga-se também a outras proteínas distintas do alvo. O fígado e os rins desempenham papéis centrais no metabolismo e excreção dos fármacos.

36.2 Os candidatos a fármacos podem ser descobertos ao acaso, por triagem ou planejamento

Muitos fármacos foram descobertos ao acaso – isto é, por observação ocasionais. O antibiótico penicilina é produzido por um fungo que contaminou acidentalmente uma placa de cultura, matando as bactérias próximas. Medicamentos como a clorpromazina e a sildenafila foram descobertos por seus efeitos benéficos sobre a fisiologia humana, totalmente diferentes dos esperados. As estatinas, que reduzem os níveis de colesterol, foram desenvolvidas após triagem de grandes quantidades de compostos à procura de atividades potencialmente interessantes. Foram desenvolvidos métodos de química combinatória para gerar grandes conjuntos de compostos quimicamente relacionados, porém diversos, para triagem. Em alguns casos, dispõem-se da estrutura tridimensional de um alvo do fármaco, e esta pode ser utilizada para ajudar no planejamento de inibidores potentes e específicos. Exemplos de medicamentos planejados dessa maneira incluem os inibidores da protease do HIV, como o indinavir, e inibidores da ciclo-oxigenase 2, como o celecoxibe.

36.3 As análises dos genomas são promissoras para a descoberta de fármacos

O genoma humano codifica aproximadamente 25.000 proteínas e muito mais se forem incluídos os derivados devido ao *splicing* alternativo do mRNA e modificação pós-traducional. As sequências do genoma podem ser examinadas para alvos potenciais de fármacos. Grandes famílias de proteínas conhecidas pela sua atuação em processos fisiológicos essenciais, como as proteínas quinases e os receptores 7TM, produziram, cada uma delas, diversos alvos para os

quais foram desenvolvidos medicamentos. Os genomas de organismos-modelo também são úteis para estudos de desenvolvimento de fármacos. As cepas de camundongos com determinados genes destruídos têm sido úteis na validação de certos alvos de medicamentos. Os genomas das bactérias, dos vírus e dos parasitos codificam muitos alvos potenciais de fármacos, que podem ser explorados em virtude de suas funções importantes e diferenças das proteínas humanas, minimizando o potencial de efeitos colaterais. As diferenças genéticas entre indivíduos podem ser examinadas e correlacionadas com diferenças observadas nas respostas aos medicamentos, ajudando potencialmente os tratamentos clínicos e o desenvolvimento de medicamentos.

36.4 O desenvolvimento de fármacos ocorre em vários estágios

Antes que os compostos possam ser administrados a seres humanos como medicamentos, eles precisam ser extensamente testados quanto a sua segurança e eficácia. Os estudos clínicos são conduzidos em vários estágios: no primeiro, testa-se a segurança; no segundo, são testadas a segurança e a eficácia em uma pequena população; e, por fim, a segurança e eficácia são investigadas em uma população maior para a detecção de efeitos adversos mais raros. Em virtude, em grande parte, das despesas associadas aos estudos clínicos, o custo para o desenvolvimento de um novo medicamento foi estimado em até 800 milhões de dólares. Mesmo quando um medicamento foi aprovado para uso, podem surgir complicações. No que concerne às doenças infecciosas e ao câncer, os pacientes frequentemente desenvolvem resistência ao medicamento após certo período de tempo de sua administração, devido ao aparecimento e à replicação de variantes do agente causador de doença que são menos suscetíveis ao medicamento, mesmo na sua presença.

Palavras-chave

ADME (p. 1039)
ateroma (p. 1048)
barreira hematencefálica (p. 1042)
biodisponibilidade oral (p. 1040)
ciclo êntero-hepático (p. 1044)
compartimento (p. 1041)
compostos xenobióticos (p. 1042)
conjugação (p. 1042)
constante de dissociação (K_d) (p. 1038)
constante de inibição (K_i) (p. 1039)
efeito colateral (p. 1039)
equação de Cheng-Prusoff (p. 1039)
glomérulo (p. 1043)
índice terapêutico (p. 1044)
ligante (p. 1038)
metabolismo de fármacos (p. 1042)
metabolismo de primeira passagem (p. 1043)
miopatia (p. 1048)
oxidação (p. 1042)

planejamento de fármacos com base na estrutura (p. 1051)
química combinatória (p. 1049)
regras de Lipinski (p. 1040)
síntese *split-pool* (dividir e misturar) (p. 1049)
transformação de fase I (p. 1043)
transformação de fase II (p. 1043)
triagem de alto rendimento (p. 1049)

Questões

1. *Caminhos para a descoberta.* Para cada um dos seguintes medicamentos, indique se os efeitos fisiológicos de cada um deles eram conhecidos antes ou após a identificação do alvo.

(a) Penicilina

(b) Sildenafila

(c) Rofecoxibe

(d) Atorvastatina

(e) Ácido acetilsalicílico

(f) Indinavir

2. *Regras de Linpinski.* Qual dos seguintes compostos satisfaz todas as regras de Lipinski? [Os valores de log(*P*) são fornecidos entre parênteses.]

(a) Atenolol (0,23)

(b) Sildenafila (3,18)

(c) Indinavir (2,78)

3. *Calculando tabelas de log.* Muitos esforços foram envidados para desenvolver programas computadorizados capazes de calcular os valores de log(*P*) baseando-se totalmente na estrutura química. Por que esses programas seriam úteis?

4. *Um pouco de prevenção.* A legislação propôs a necessidade de acrescentar *N*-acetilcisteína aos comprimidos de paracetamol. Especule o papel desse aditivo.

5. *Planejamento de estudos clínicos.* Diferencie estudos clínicos de fase 1 e de fase 2 quanto ao número de indivíduos recrutados, ao estado de saúde dos indivíduos e às metas do estudo.

6. *Interações medicamentosas.* Conforme assinalado neste capítulo, a varfarina pode ser um medicamento muito perigoso, visto que a sua administração em excesso pode causar sangramento incontrolável. Indivíduos em uso de varfarina precisam ter cuidado com a administração de outros medicamentos, particularmente os que se ligam à albumina. Proponha um mecanismo para essa interação medicamentosa.

7. *Péssima combinação.* Explique por que os medicamentos que inibem as enzimas do citocromo P450 podem ser particularmente perigosos quando usados em associação a outros medicamentos.

8. *Modo operacional.* Cite uma vantagem de um inibidor não competitivo como medicamento potencial em comparação com um inibidor competitivo.

9. *Uma ajuda.* Você desenvolveu um medicamento capaz de inibir o transportador ABC RMF (resistência múltipla a fármacos). Sugira uma possível aplicação para esse fármaco na quimioterapia do câncer.

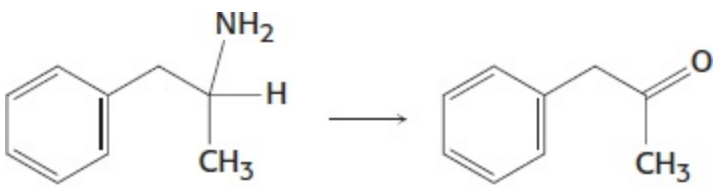
10. *Encontrando o alvo.* Os tripanossomos são parasitos unicelulares que causam a doença do sono. Durante um estágio de seu ciclo de vida, esses organismos vivem na corrente sanguínea e obtêm toda a sua energia da glicólise, encontrada em uma organela especializada, denominada glicossomo, dentro do parasito. Proponha alvos potenciais para o tratamento da doença do sono. Cite algumas possíveis dificuldades com a sua abordagem.

11. *Conhecer é poder.* Como a informação genômica poderia ser útil para o uso efetivo do mesilato de imatinibe na quimioterapia do câncer?

12. *Múltiplos alvos, mesma meta.* A sildenafila induz os seus efeitos fisiológicos por meio do aumento das concentrações intracelulares de cGMP, resultando em relaxamento muscular. Com base no esquema apresentado na Figura 36.17, identifique outra abordagem para aumentar os níveis de cGMP com uma pequena molécula.

Questão sobre mecanismo

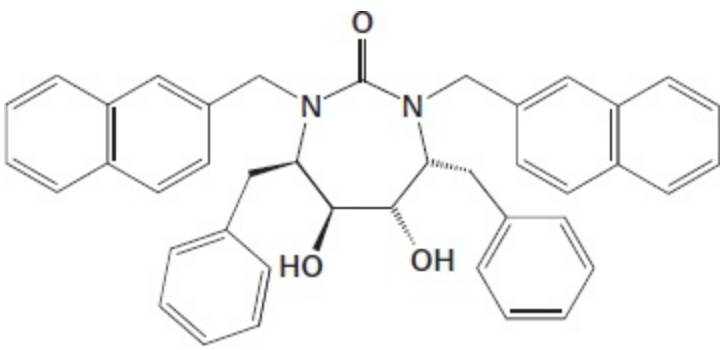
13. *Variações sobre um tema.* O metabolismo da anfetamina pelas enzimas do citocromo P450 resulta na conversão apresentada aqui. Proponha um mecanismo e indique quaisquer produtos adicionais.



Anfetamina

Questão | Interpretação de dados

14. *Planejamento de inibidores da protease do HIV.* O composto A está entre uma série de compostos planejados para serem potentes inibidores da protease do HIV.



Composto A

O composto A foi testado com o uso de dois ensaios: (1) inibição direta da protease do HIV *in vitro*

e (2) inibição da produção de RNA viral em células infectadas pelo HIV, uma medida da replicação viral. Os resultados desses ensaios são apresentados adiante. A atividade de protease do HIV é medida com um substrato peptídico presente em uma concentração igual a seu valor de K_M.

Composto A (nM)	Atividade de protease do HIV (unidades arbitrárias)
0	11,2
0,2	9,9
0,4	7,4
0,6	5,6
0,8	4,8
1	4,0
2	2,2
10	0,9
100	0,2

Composto A (nM)	Produção de RNA viral (unidades arbitrárias)
0	760
1,0	740
2,0	380
3,0	280
4,0	180
5,0	100
10	30
50	20

Calcule os valores de K_I do composto A no ensaio de atividade de protease e de seu IC_{50} no ensaio de produção de RNA viral.

O tratamento de ratos com uma dose oral relativamente alta de 20 mg kg^{-1} resulta em uma concentração máxima do composto de 0,4 μM. Com base nesse valor, você esperaria que o composto A fosse efetivo na prevenção da replicação do HIV se administrado por via oral?

Respostas

Capítulo 1

1. Os doadores de pontes de hidrogênio são os grupos NH e NH_2. Os receptores de pontes de hidrogênio são os átomos de oxigênio do carbonil e aqueles átomos de nitrogênio do anel, que não estão ligados ao hidrogênio ou à desoxirribose.

2. Permute as posições das ligações simples e duplas no anel de seis componentes.

3. (a) Interações eletrostáticas; (b) interações de van der Waals.

4. Processos *a* e *b*.

5. $\Delta S_{sistema} = -661$ J mol^{-1} K^{-1} (-158 kcal mol^{-1} K^{-1})

$\Delta S_{ambiente} = +842$ J mol^{-1} K^{-1} ($+201$ cal mol^{-1} K^{-1})

6. (a) 1,0; (b) 13,0; (c) 1,3; (d) 12,7

7. 2,88

8. 1,96

9. 11,83

10. 447; 0,00050

11. 0,00066 M

12. 6,0

13. 5,53

14. 6,48

15. 7,8

16. 100

17. (a) 1,6; (b) 0,51; (c) 0,16

18. 0,1 M de solução de acetato de sódio: 6,34; 6,03; 5,70; 4,75.

19. 90 mM de ácido acético; 160 mM de acetato de sódio, 0,18 mol de ácido acético, 0,32 mol de acetato de sódio; 10,81 g de ácido acético; 26,25 g acetato de sódio.

20. 0,50 mol de ácido acético; 0,32 mol de NaOH; 30,03 g de ácido acético; 12,80 g de NaOH.

21. 250 mM; sim; não, também conterá 90 mM de NaCl.

22. 8,63 g de Na_2HPO_4; 4,71 g de NaH_2PO_4

23. 7,0; este tampão não será muito útil, porque o valor de pH é distante do valor de pK_a.

24. 1,45 kJ mol^{-1} (0,35 kcal mol^{-1}); 57,9 kJ mol^{-1} (13,8 kcal mol^{-1})

25. Haverá aproximadamente 15 milhões de diferenças.

Capítulo 2

1. (A) Prolina, Pro, P; (B) tirosina, Tyr, Y; (C) leucina, Leu, L; (D) Lisina, Lys, K.

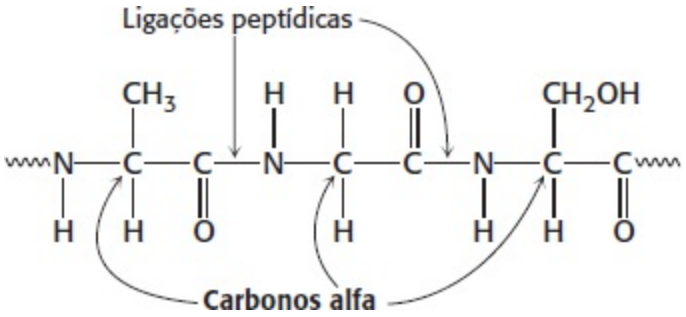
2. (a) C, B, A; (b) D; (c) D, B; (d) B, D; (e) B.

3. (a) 6; (b) 2; (c) 3; (d) 1; (e) 4; (f) 5.

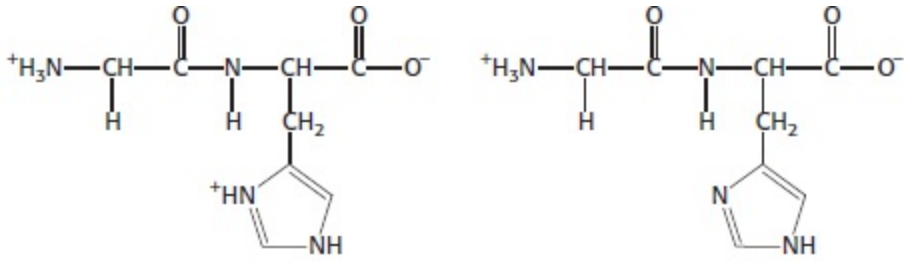
4. (a) Ala; (b) Tyr; (c) Ser; (d) His.

5. Ser, Glu, Tyr, Thr

6. (a) Alanina-glicina-serina; (b) Alanina; (c e d):

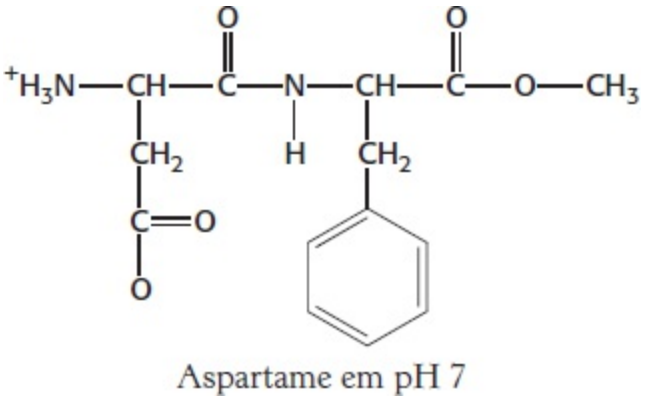


7.



8. Há 20 possibilidades para cada um dos 50 aminoácidos: 50^{20} ou 5×10^{21}.

9.



10. A unidade repetitiva (nitrogênio-carbono a-carbono carbonil).

11. A cadeia lateral é o grupo funcional ligado ao átomo de carbono α de um aminoácido.

12. A composição dos aminoácidos refere-se simplesmente aos aminoácidos que constituem a proteína. A ordem não é especificada. A sequência de aminoácidos é a mesma da estrutura primária – a sequência de aminoácidos do amino ao carboxiterminal da proteína. Proteínas diferentes podem ter a mesma composição de aminoácidos, mas a sequência de aminoácidos identifica uma proteína individual.

13. (a) Cada fita tem 35 kDa e, portanto, tem cerca de 318 resíduos (a massa média do resíduo é de 110 dáltons). Como a elevação por resíduo em uma hélice a é de 1,5 Å, o comprimento é de 477 Å. Mais precisamente, para uma super-hélice α, a elevação por resíduo é de 1,46 Å; então, o comprimento é de 464 Å. (b) Dezoito resíduos em cada fita (40 menos 4, dividido por 2) têm conformação em folha β. Como a elevação por resíduo é de 3,5 Å, o comprimento é de 63 Å.

14. O grupo metil ligado ao átomo de carbono β da isoleucina interfere estericamente na formação da hélice α. Na leucina, este grupo metil está ligado ao átomo de carbono γ (gama), que é mais distante da cadeia principal e, portanto, não interfere.

15. A primeira mutação destrói a atividade porque a valina ocupa mais espaço do que a alanina e, assim, a proteína precisa adquirir uma forma diferente, considerando que este resíduo encontra-se no interior da proteína intensamente compacto. A segunda mutação recupera a atividade por conta da redução de volume compensatória; a glicina é menor que a isoleucina.

16. A conformação nativa da insulina não é a forma mais termodinamicamente estável, porque ela contém duas cadeias unidas por pontes dissulfeto. A insulina é formada pela pré-insulina, um precursor de cadeia única precursora que é clivado para formar a insulina, uma molécula de 51 resíduos, depois que as pontes dissulfeto são formadas.

17. Um segmento da cadeia principal da protease pode estabelecer pontes de hidrogênio com a cadeia principal do substrato para formar

um par de fitas β paralelas ou antiparalelas.

18. A glicina tem a menor cadeia lateral entre todos os aminoácidos. Seu tamanho é geralmente crítico ao permitir que cadeias polipeptídicas façam curvas tortuosas ou que se aproximem muito umas das outras.

19. O glutamato, o aspartato e o carboxilato terminal podem formar pontes salinas com o grupo guanidínio da arginina. Além disso, este grupo pode ser um doador de pontes de hidrogênio às cadeias laterais da glutamina, asparagina, serina, treonina, aspartato, tirosina e glutamato e à cadeia principal do grupo carbonil. A histidina pode formar pontes de hidrogênio com a arginina em pH 7.

20. As pontes dissulfeto no cabelo são quebradas por meio da adição de um reagente que contenha tiol, em conjunto com aplicação tênue de calor. O cabelo é encaracolado e um agente oxidante é adicionado para reestabelecer as pontes dissulfeto e estabilizar a forma desejada.

21. Algumas proteínas que atravessam as membranas biológicas são "as exceções que confirmam as regras", porque elas têm a distribuição reversa de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos. Por exemplo, considere as *porinas,* proteínas encontradas nas membranas externas de muitas bactérias. As membranas são feitas principalmente de cadeias hidrofóbicas. Assim, as porinas são, em boa parte, cobertas, na face externa, com resíduos hidrofóbicos que interagem com as cadeias hidrofóbicas vizinhas. Ao contrário, o centro da proteína contém muitos aminoácidos polares e carregados que circundam um canal hidratado que ocupa o centro da proteína. Assim, como as porinas funcionam em um ambiente hidrofóbico, elas são "de dentro para fora" em relação às proteínas que funcionam em solução aquosa.

22. Os aminoácidos seriam de natureza hidrofóbica. Uma α-hélice é especialmente adequada para atravessar a membrana porque todos os átomos de hidrogênio amida e átomos de oxigênio carbonil do arcabouço peptídico participam das pontes de hidrogênio internas, estabilizando estes átomos polares em um ambiente hidrofóbico.

23. Este exemplo demonstra que os valores pK_a são afetados pelo ambiente. Um dado aminoácido pode ter uma variedade de valores de pK_a, dependendo do ambiente químico interno da proteína.

24. Uma possível explicação é que a gravidade dos sintomas corresponda ao grau de alteração estrutural. Desta maneira, a substituição da alanina por glicina poderia causar sintomas mais moderados, mas a substituição do triptofano, que é muito maior, pode prejudicar ou mesmo impedir a formação da tripla-hélice de colágeno.

25. A barreira energética que deve ser superada para que se passe do estado polimerizado para o hidrolisado é grande, mesmo que a reação seja termodinamicamente favorável.

26. Usando a equação de Henderson-Hasselbach, encontramos que a razão de alanina-COOH para alanina-COO^-, em pH 7, é de 10^{-4}. A razão de alanina-NH_2 para alanina-NH_3^+, determinada da mesma maneira, é de 10^{-1}. Desta maneira, a razão de alanina neutra para as espécies zwiteriônicas é de $10^{-4} \times 10^{-1} = 10^{-5}$.

27. A disposição da configuração absoluta exige a determinação de prioridades para os quatro grupos conectados ao átomo de carbono tetraédrico. Para todos os aminoácidos, à exceção da cisteína, as prioridades são (1) grupo amino; (2) grupo carbonil; (3) cadeia lateral; (4) hidrogênio. Para a cisteína, em razão do átomo de enxofre em sua cadeia lateral, esta tem maior prioridade que o grupo carbonil, levando-a a assumir uma configuração *R*, em vez de *S*.

28. ELVISISLIVINGINLASVEGAS

29. Não, a Pro-X teria características de qualquer outra ligação peptídica. O entrave estérico na X-Pro ocorre porque o grupo R da Pro é ligado ao grupo amino. Assim, na X-Pro, o grupo R da prolina está próximo ao grupo R de X, o que não ocorreria na Pro-X.

30. A, c; B, e; C, d; D, a; E, b.

31. A razão é que pontes dissulfetos incorretas se formam na ureia. Há 105 formas diferentes de parearmos oito moléculas de cisteína para formar quatro pontes dissulfetos; apenas uma destas combinações é enzimaticamente ativa. Os 104 pareamentos incorretos foram pitorescamente chamados de ribonuclease "emaranhada".

Capítulo 3

1. (a) Fenil isotiocianato; (b) ureia; (c) β-mercaptoetanol para reduzir os dissulfetos; (c) quimiotripsina; (d) CNBr; (e) tripsina.

2. Cada resíduo de aminoácido, exceto o resíduo carboxiterminal, dá origem a hidrazida ao reagir com a hidrazina. O resíduo carboxiterminal pode ser identificado porque ele gera um aminoácido livre.

3. A cadeia lateral *S*-aminoetilcisteína assemelha-se à da lisina. A única diferença é um átomo de enxofre no lugar do grupo metileno.

4. Uma solução de 1 mg ml^{-1} de mioglobina (17,8 kDa; Tabela 3.2) corresponde a $5{,}62 \times 10^{-5}$ M. A absorbância de um comprimento de 1 cm é 0,84, que corresponde a uma relação I_0/I de 6,96. Assim, 14,4% da luz incidente é transmitida.

5. A amostra foi diluída 1.000 vezes. A concentração após a diálise é, então, de 0,001 M ou 1 mM. Você pode reduzir a concentração de

sal ao dialisar sua amostra, agora a 1 mM, em mais tampão livre de $(NH_4)_2SO_4$.

6. Se a concentração salina se torna muito alta, os íons de sal interagem com as moléculas de água. Eventualmente, não haverá moléculas de água suficientes para interagir com a proteína, e a proteína irá precipitar. Se falta sal na solução de proteína, as proteínas podem interagir umas com as outras – as cargas positivas de uma proteína com as cargas negativas de outra(s) proteína(s). Tal agregado se torna muito grande para ser solubilizado apenas por água. Se se adiciona sal, ele neutraliza as cargas das proteínas, prevenindo interações do tipo proteína-proteína.

7. A tropomiosina tem a forma de bastão, enquanto a hemoglobina é aproximadamente esférica.

8. O coeficiente friccional, *f*, e a massa, *m*, determinam *s*. Especificamente, *f* é proporcional a *r* (ver a equação 2 na página 73). Assim, *f* é proporcional a $m^{1/3}$ e *s* é proporcional a $m^{2/3}$ (ver a equação na página 78). Uma proteína esférica de 80 kDa sedimenta 1,59 vez mais rápido que uma proteína esférica de 40 kDa.

9. A cauda hidrofóbica longa da molécula de SDS (ver página 74) rompe as interações hidrofóbicas no interior da proteína. A proteína desnatura, com os grupos R hidrofóbicos agora interagindo com o SDS, e não entre si.

10. 50 kDa.

11. A proteína pode estar modificada. Por exemplo, a serina, a treonina, e a tirosina podem ter grupos fosfatos ligados.

12. Um derivado marcado por fluorescência de um produto de degradação bacteriano (p. ex., um peptídio formilmetionil) se ligaria às células contendo o receptor de interesse.

13. (a) A tripsina quebra após a arginina (R) e lisina (K), gerando AVGWR, VK e S. Como eles têm tamanhos diferentes, estes produtos poderiam ser separados por cromatografia de exclusão molecular. (b) A quimiotripsina, que quebra após grupos R grandes ou alifáticos, gera dois peptídios de mesmo tamanho (AVGW) e (RVKS). A separação baseada no tamanho não seria efetiva. O peptídio RVKS tem duas cargas positivas (R e K), enquanto o outro peptídio é neutro. Assim, os dois produtos poderiam ser separados por cromatografia de troca iônica.

14. As moléculas de anticorpos ligadas a um suporte sólido podem ser usadas para purificação por afinidade de proteínas para as quais a molécula ligante não é conhecida ou indisponível.

15. Se o produto da reação catalisada pela enzima for altamente antigênico, pode ser possível obter anticorpos para esta molécula em particular. Estes anticorpos podem ser usados para detectar a presença do produto por ELISA, promovendo um ensaio adequado para a purificação desta enzima.

16. Um inibidor da enzima a ser purificada pode ter estado presente e subsequentemente removido por uma etapa de purificação. Esta remoção levaria a um aumento aparente na quantidade total de enzima presente.

17. Muitas proteínas têm massas similares, mas sequências e padrões diferentes quando digeridas por tripsina. O conjunto das massas dos peptídios trípticos forma uma "impressão digital" detalhada de uma proteína e que é muito pouco provável de aparecer de maneira aleatória em outras proteínas, independente do tamanho. (Uma analogia aceitável é: "assim como dedos de mesmo tamanho terão impressões digitais diferentes e individuais, também as proteínas de mesmo tamanho fornecerão padrões diferentes de digestão pela tripsina.")

18. A isoleucina e a leucina são isômeros e, por isso, têm massas idênticas. O sequenciamento de peptídios por espectroscopia de massa, como descrito neste capítulo, é incapaz de distinguir estes resíduos. Técnicas analíticas adicionais são necessárias para diferenciar estes resíduos.

19. Veja a tabela a seguir.

Procedimento de purificação	Proteína total (mg)	Atividade total (unidades)	Atividade específica (unidades por mg^{-1})	Nível de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	20.000	4.000.000	200	1	100
Precipitação com $(NH_4)_2SO_4$	5.000	3.000.000	600	3	75
Cromatografia com DEAE-celulose	1.500	1.000.000	667	3,3	25
Cromatografia de filtração em gel	500	750.000	1.500	7,5	19
Cromatografia de afinidade	45	675.000	15.000	75	17

20. A formação de cristais de proteína demanda uma organização ordenada de moléculas posicionadas de maneira idêntica. As proteínas com ligações flexíveis podem introduzir certa desordem nesta organização e prevenir a formação de cristais adequados. Um ligante ou parceiro de ligação pode induzir uma conformação ordenada a estas ligações flexíveis e pode ser incluído na solução para facilitar o crescimento de cristais. Alternativamente, os domínios individuais separados por estas ligações podem ser expressos por métodos recombinantes e suas estruturas cristalizadas, resolvidas separadamente.

21. O tratamento com ureia irá quebrar as ligações não covalentes. Deste modo, a proteína original de 60 kDa deve ser feita por duas subunidades de 30 kDa. Quando estas subunidades são tratadas com ureia e β-mercaptoetanol, uma espécie única de 15 kDa aparece, sugerindo que pontes dissulfeto ligam as subunidades de 30 kDa.

22. (a) A repulsão eletrostática entre os grupos ε-amino positivamente carregados prejudica a formação de α-hélices em pH 7. Em pH 10, as cadeias laterais se tornam desprotonadas, permitindo a formação da α-hélice.

(b) Poli-L-glutamato é uma mola aleatória em pH 7 que se torna uma α-hélice abaixo do pH 4,5 porque os grupos γ-carboxilados se tornam protonados.

23. A diferença entre as massas previstas e observadas deste fragmento é igual a 28,0, exatamente a mudança de massa que seria esperada em um peptídio formilado. Este peptídio é provavelmente formilado em sua extremidade aminoterminal, e corresponde ao fragmento mais N-terminal da proteína.

24. A luz foi usada para dirigir a síntese destes peptídios. Cada aminoácido adicionado ao suporte sólido continha um grupo protetor fotolábil, em vez de um grupo protetor *t*-Boc em seu grupo α-amino. A iluminação das regiões selecionadas do suporte sólido levou à liberação do grupo protetor, que expôs os grupos amino nestas regiões para torná-las reativas. O padrão de máscaras usadas nestas iluminações e a sequência de reagentes definem os produtos finais e suas localizações.

25. A espectrometria de massa é altamente sensível e capaz de detectar a diferença de massa entre uma proteína e sua contrapartida com deutério. Técnicas de fragmentação podem ser usadas para identificar os aminoácidos que retenham o isótopo. Alternativamente, a espectroscopia de RM pode ser usada para detectar os átomos marcados porque o deutério e o próton têm propriedades de spin nuclear bem diferentes.

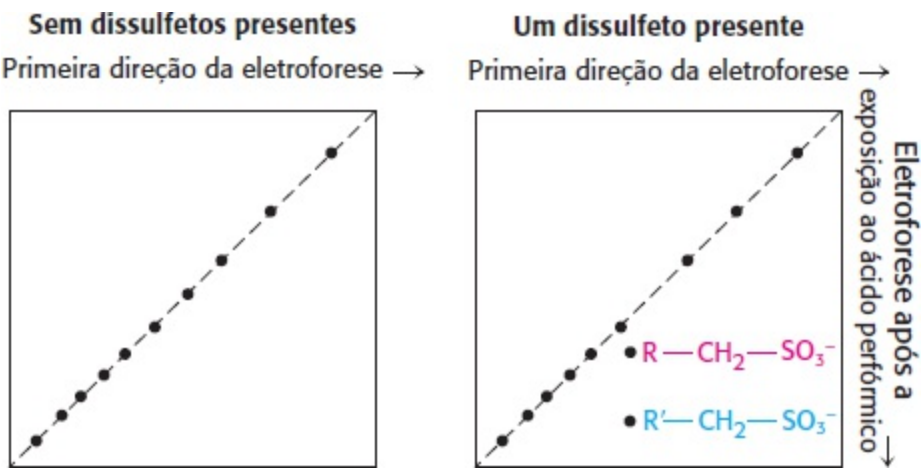
26. Primeiro aminoácido: A

Último aminoácido: R (não é quebrado por carboxipeptidase)
Sequência do peptídio tríptico N-terminal: AVRY (peptídios trípticos terminam em K)
Sequência do peptídio quimiotríptico N-terminal: AVRY (peptídios quimiotrípticos terminam em Y)
Sequência: AVRYSR

27. Primeiro aminoácido: S

Último aminoácido: L
Quebra por brometo de cianogênio: M na 10a posição
Os resíduos C-terminais são: (2S, L, W)
Resíduos N-terminais: (G, K, S, Y), peptídio tríptico, termina em K.
Sequência aminoterminal: SYGK
Ordem dos peptídios quimiotrípticos: (S, Y), (G, K, L), (F, I, S), (M, T), (S, W), (S, L).
Sequência: SYGKLSIFTMSWSL

28. Se a proteína não contivesse pontes dissulfeto, a mobilidade eletroforética dos fragmentos de tripsina seria a mesma antes e depois do tratamento com ácido perfórmico: todos os fragmentos se disporiam ao longo da diagonal do papel. Se uma ponte dissulfeto estivesse presente, os fragmentos de tripsina ligados ao dissulfeto se disporiam como picos após o tratamento com ácido perfórmico. O resultado seria de dois picos aparecendo fora da diagonal.



Estes fragmentos poderiam então ser isolados do papel de cromatografia e analisados por espectrometria de massa para determinar sua composição de aminoácidos e assim identificar as cisteínas participantes na ponte dissulfeto.

Capítulo 4

1. Um nucleosídio é uma base ligada a um açúcar ribose. Um nucleotídio é um nucleosídio com um ou mais grupos fosfato ligados à ribose.

2. O pareamento de pontes de hidrogênio entre a base A e a T, assim como o pareamento de pontes de hidrogênio entre a base G e a base C no DNA.

3. T é sempre igual a A, assim estes dois nucleotídios constituem 40% das bases. G é sempre igual a C, e assim os 60% restantes devem ser 30% de G e 30% de C.

4. Nada, porque as regras de pareamento de bases não se aplicam aos ácidos nucleicos de fita única.

5. (a) TTGATC; (b) GTTCGA; (c) ACGCGT; (d) ATGGTA.

6. (a) [T] + [C] = 0,46. (b) [T] = 0,30, [C] = 0,24, e [A] + [G] = 0,46.

7. Pontes de hidrogênio estáveis ocorrem apenas entre os pares GC e AT. Além disso, duas purinas são muito grandes para caber dentro da dupla-hélice e duas pirimidinas, muito pequenas para formarem pares de base entre si.

8. A energia térmica faz com que as fitas se afrouxem, o que quebra as pontes de hidrogênio entre os pares de bases, e as forças de empilhamento entre as bases, o que causa a separação das fitas.

9. A probabilidade de qualquer sequência aparecer é 4^n, em que 4 é o número de nucleotídios e n é o comprimento da sequência. A probabilidade de qualquer sequência de 15 bases aparecer é de $1/4^{15}$ ou 1/1.073.741.824. Assim, uma sequência de 15 nucleotídios poderia aparecer aproximadamente três vezes (3 bilhões × probabilidade de aparecimento). A probabilidade de uma sequência com 16 bases é de $1/4^{16}$, o que é igual a 1/4.294.967.296. Tal sequência seria improvável de aparecer mais do que uma vez.

10. Uma extremidade de um polímero de ácido nucleico termina com um grupo hidroxila 5' livre (ou um grupo fosfato esterificado ao grupo hidroxila) e a outra extremidade tem um grupo hidroxila 3' livre. Assim, as extremidades são diferentes. Duas cadeias de DNA podem formar uma dupla-hélice apenas se as cadeias estiverem em direções opostas – isto é, tiverem polaridade oposta.

11. Embora as ligações individuais sejam fracas, o total de milhões de tais ligações promove muita estabilidade. Há força nos números.

12. Haveria muita repulsão por parte das cargas negativas dos grupos fosfato. Estas cargas devem ser balanceadas pela adição de cátions.

13. As três formas são A-DNA, B-DNA e Z-DNA, sendo a forma B a mais comum. Há muitas diferenças (ver Tabela 4.2); algumas das principais são que A-DNA e B-DNA têm sentido horário, enquanto o Z-DNA tem sentido anti-horário. A forma A é mais curta e mais larga que a forma B.

14. $5{,}88 \times 10^3$ pares de base.

15. Na replicação conservativa, após 1,0 geração, metade das moléculas seriam de ^{15}N-^{15}N e a outra metade de ^{14}N-^{14}N. Após 2,0 gerações, um quatro das moléculas seria de ^{15}N-^{15}N e os outros três quartos, de ^{14}N-^{14}N. Híbridos de ^{14}N-^{15}N não seriam observados na replicação conservativa.

16. (a) Timina tritiada ou timidina tritiada.

(b) dATP, dGTP, dCTP, TTP marcados com ^{32}P no átomo mais interno de fósforo (α).

17. As moléculas nas partes *a* e *b* não levariam à síntese de DNA, porque elas não têm um grupo 3'-OH (iniciador). A molécula na parte

d tem um grupo 3' – OH livre em uma extremidade de cada fita, mas não tem fita molde. Apenas a molécula na parte *c* poderia levar à síntese de DNA.

18. Um retrovírus é um vírus que tem RNA como seu material genético. No entanto, para que a informação seja expressa, ela deve primeiramente ser convertida em DNA, uma reação catalisada pela enzima transcriptase reversa. Assim, pelo menos inicialmente, o fluxo da informação é oposto ao da célula normal: RNA → DNA, em vez do DNA → RNA.

19. Um oligonucleotídio de timidilato poderia ser usado como iniciador. O molde de poli(A) especifica a incorporação de T; assim, o trifosfato de timidina radioativo (marcado no grupo fosfato α) poderia ser usado no ensaio.

20. A ribonuclease serve para degradar a fita de RNA, uma etapa necessária na formação do DNA dupla fita a partir do híbrido RNA-DNA.

21. Tratar uma alíquota da amostra com ribonuclease e a outra com desoxirribonuclease. Testar estas amostras tratadas com nuclease para testar a atividade infecciosa.

22. A desaminação muda o par de bases original G-C para um par G-U. Após uma etapa de replicação, um dupla fita filha terá um par G-C e a outra terá um par A-U. Após duas etapas de replicação, haverá dois pares G-C, um par A-U e um par A-T.

23. (a) $4^8 = 65.536$. Na terminologia de informática, há 64K 8-mers de DNA.

(b) Um bit especifica duas bases (p. ex., A e C) e um segundo bit especifica outras duas (G e T). Assim, dois bits são necessários para especificar um nucleotídio (par de bases) no DNA. Por exemplo, 00, 01, 10 e 11 codificariam A, C, G e T. Um 8-mer armazena 16 bits ($2^{16} = 65.536$), o genoma da *E. coli* ($4{,}6 \times 10^6$ pb) armazena $9{,}2 \times 10^6$ bits e o genoma humano ($3{,}0 \times 10^9$ pb) armazena $6{,}0 \times 10^9$bits de informação genética.

(c) Um CD padrão pode armazenar cerca de 700 MB, o que é igual a $5{,}6 \times 10^9$ bits. Um grande número de sequências de 8-mer poderia ser armazenado neste CD. A sequência de DNA da *E. coli* poderia ser escrita em um único CD e ainda sobraria espaço para bastante música. Um CD não seria suficiente para armazenar todo o genoma humano.

24. (a) Desoxirribonucleotídios trifosfatos *versus* ribonucleotídios trifosfatos.

(b) 5' → 3' para ambos.

(c) Semiconservativa para a DNA polimerase I; conservativa para a RNA polimerase.

(d) DNA polimerase I precisa de um iniciador, enquanto a RNA polimerase não precisa.

25. O RNA mensageiro codifica informação que, na tradução, gera uma proteína. O RNA ribossômico é um componente catalítico dos ribossomos, os complexos moleculares que sintetizam as proteínas. O RNA transportador é uma molécula adaptadora, capaz de se ligar a um aminoácido específico e reconhecer o códon correspondente. Os RNA transportadores com aminoácidos ligados são os substratos dos ribossomos.

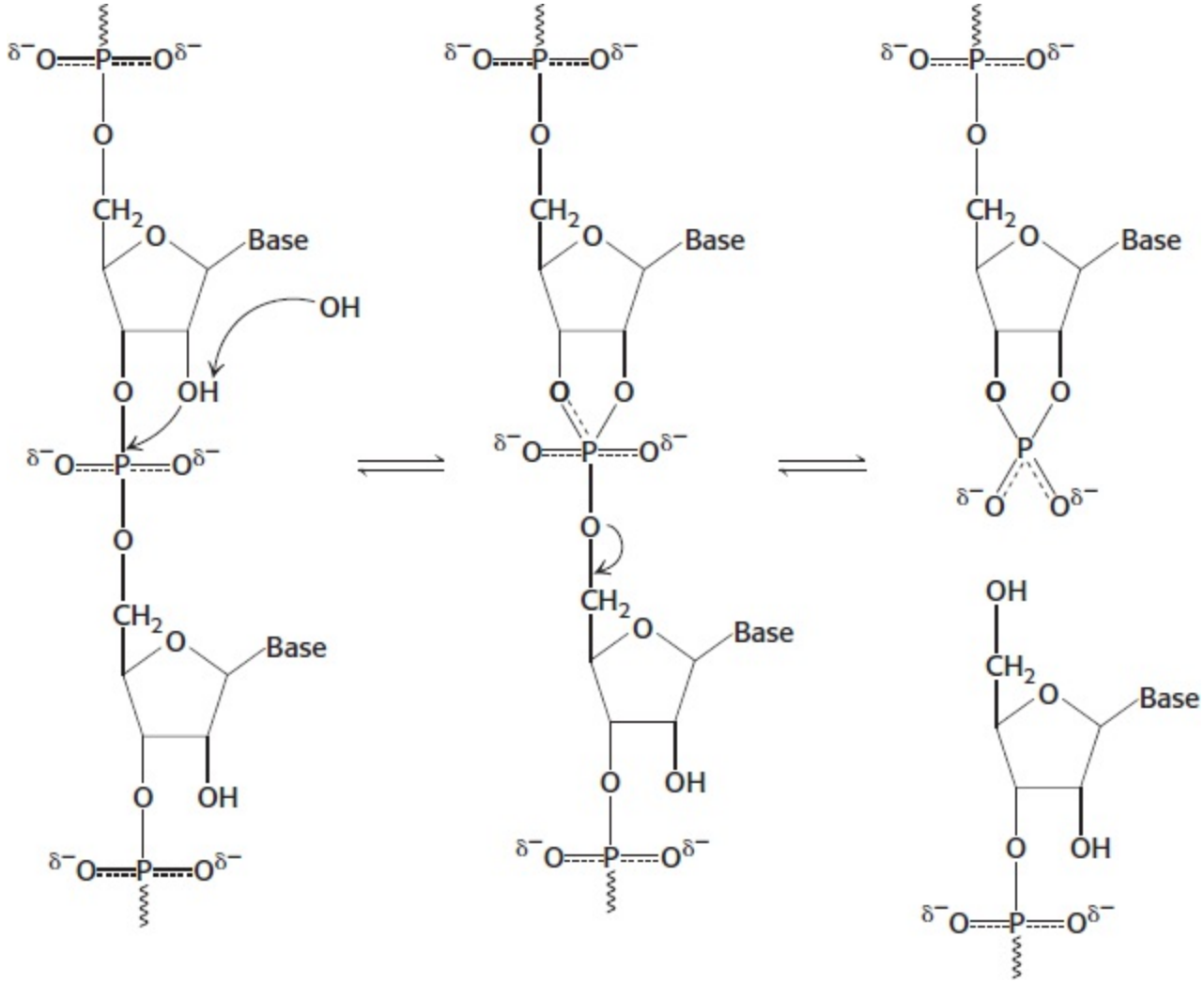
26. (a) 5'-UAACGGUACGAU-3'

(b) Leu-Pro-Ser-Asp-Trp-Met

(c) Poli(Leu-Leu-Thr-Tyr)

27. O grupo 2'-OH no RNA atua como um nucleófilo intramolecular. Na hidrólise alcalina do RNA, ele forma um intermediário 2'-3'cíclico.

28.



29. A expressão gênica é o processo de expressar a informação de um gene e sua forma molecular funcional. Para muitos genes, a informação funcional é uma molécula de proteína. Desta forma, a expressão gênica inclui a transcrição e a tradução.

30. Uma sequência de nucleotídios cujas bases representem os mais comuns, mas não necessariamente os únicos, membros da sequência. Uma sequência de consenso pode ser vista como uma representação da média de muitas sequências similares.

31. A cordicepina termina a síntese de RNA. Uma cadeia de RNA contendo cordicepina não tem um grupo 3'-OH.

32. Apenas o RNA de fita única serve como molde para a síntese de proteínas.

33. A degeneração do código refere-se ao fato de que a maioria dos aminoácidos é codificada por mais de um códon.

34. Se apenas 20 dos 64 códons possíveis codificassem aminoácidos, uma mutação que alterasse um códon teria mais chance de resultar em um códon sem sentido, levando à terminação da síntese de proteína. Com a degeneração, uma mudança de nucleotídio pode gerar um sinônimo ou um códon para um aminoácido com propriedades químicas similares.

35. (a) 2, 4, 8; (b) 1, 6, 10; (c) 3, 5, 7, 9.

36. (a) 3; (b) 6; (c) 2; (d) 5; (e) 7; (f) 1; (g) 4.

37. A incubação com a RNA polimerase e apenas UTP, ATP e CTP leva à síntese de apenas poli(UAC). Apenas o poli(GUA) foi formado quando o GTP foi usado no lugar de CTP.

38. Um peptídio terminando em Lys (UGA é um códon de terminação), outro contendo -Asn-Glu- e um terceiro contendo -Met-Arg-.

39. Resíduos muito abundantes de aminoácidos têm mais códons (p. ex., Leu e Ser têm seis cada), enquanto os aminoácidos menos abundantes têm menos códons (Met e Trp têm apenas um cada). A degeneração (1) permite a variação na composição da base e (2) diminui a chance de que uma substituição de uma base vá mudar o aminoácido codificado. Se a degeneração fosse igualmente distribuída, cada um dos 20 aminoácidos teria três códons. Ambos os benefícios (1 e 2) são maximizados pela associação de mais códons com os aminoácidos mais comuns do que com aqueles menos frequentes.

40. Phe-Cis-His-Val-Ala-Ala

41. A reorganização dos éxons é um processo molecular que pode levar à geração de novas proteínas pelo rearranjo dos éxons dentro dos genes.

42. Ele mostra que o código genético e os meios bioquímicos de interpretar o código são comuns mesmo para formas de vida bem distantes. Isso atesta a unidade da vida, que toda a vida surgiu de um ancestral comum.

43. (a) Um códon para a lisina não pode ser mudado para o aspartato pela mutação de apenas um nucleotídio. (b) Arg, Asn, Gln, Glu, Ile, Met ou Thr.

44. O código genético é degenerado. Dos 20 aminoácidos, 18 são especificados por mais de um códon. Assim, muitas mudanças de nucleotídios (especialmente na terceira base do códon) não alteram a natureza do aminoácido codificado. Mutações que levam a um aminoácido alterado são geralmente mais deletérias que aquelas que não o alteram e, portanto, sujeitas a uma seleção mais rigorosa.

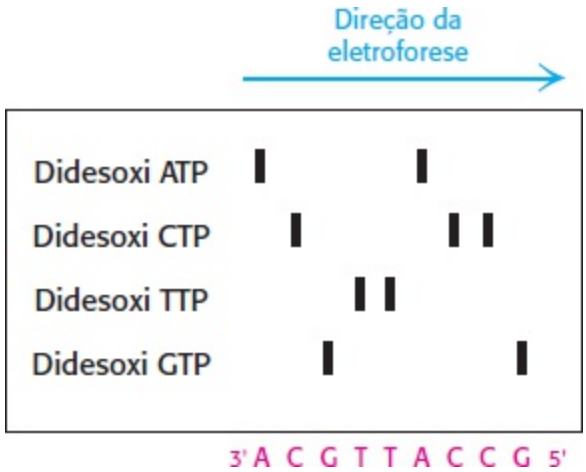
45. Os pares de base GC têm três pontes de hidrogênio, em comparação com as duas dos pares AT. Assim, quanto maior o conteúdo de GC, maior o número de pontes de hidrogênio e maior a estabilidade da hélice.

46. O valor de C_0t essencialmente corresponde à complexidade da sequência do DNA – em outras palavras, quanto tempo levará para que uma sequência de DNA encontre sua fita complementar para formar uma dupla-hélice. Quanto mais complexo for o DNA, mais lentamente ele se reassociará para formar a dupla hélice.

Capítulo 5

1. (a) 5'-GGCATAC-3'

(b) O método de sequenciamento didesoxi de Sanger forneceria o padrão de gel mostrado aqui.



2. O cDNA da ovoalbumina deveria ser usado. A *E. coli* carece do maquinário para excisar *(splicing)* o transcrito primário obtido a partir do DNA genômico.

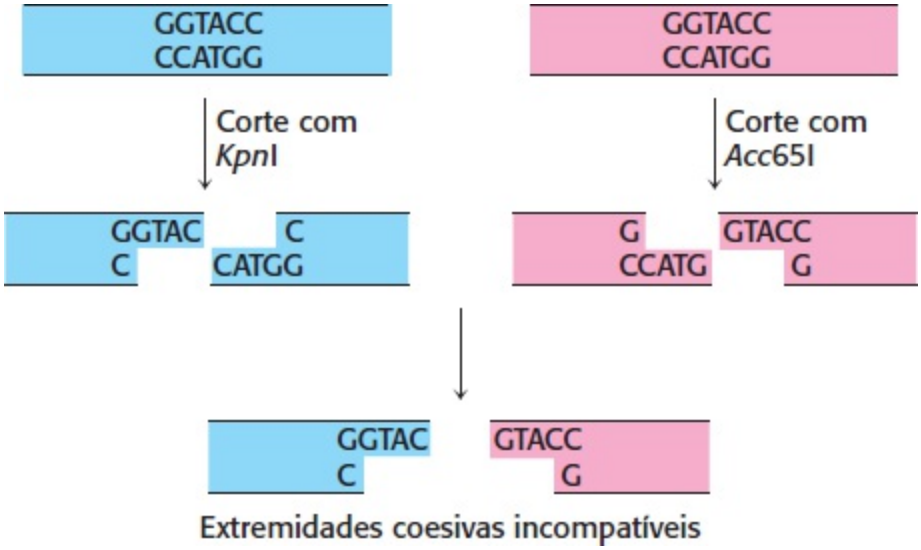
3. Condizente com sua estrutura planar e aromática, o brometo de etídio é um intercalador de DNA: ele se alinha entre as bases pareadas em um DNA de fita dupla.

4. A presença da sequência *Alu*I seria, em média, de $(1/4)^4$ ou 1/256, porque a chance da base começar em qualquer posição é de um quarto e há quatro posições. Pelo mesmo raciocínio, a presença da sequência *Not*I seria de $(1/4)^8$ ou 1/65.536. Desta maneira, um produto médio da digestão por *Alu*I teria 250 pares de base de comprimento (0,25 kb), enquanto aquele da *Not*I teria 66.000 pares de base (66 kb) de comprimento.

5. Não, porque a maioria dos genes humanos é mais extenso que 4 kb. Um fragmento conteria apenas uma pequena parte do gene completo.

6. O *Southern blot* de um digesto de *Mst*II faria distinção entre o gene normal e o mutante. A perda de um local de restrição levaria à substituição de dois fragmentos no *Southern blot* por um fragmento maior. Tal resultado não provaria que o GTG foi substituído por GAG; outras mudanças de sequência no local de restrição poderiam levar ao mesmo resultado.

7. Embora as duas enzimas cortenham o mesmo local de reconhecimento, cada uma delas corta pontes diferentes na sequência de 6 pb. A clivagem pela *Kpn*I fornece uma excedente na fita 3', enquanto a clivagem com a *Acc65*I produz um excedente na fita 5'. Estas extremidades coesivas não se sobrepõem.



8. Uma estratégia simples para a geração de muitos mutantes é sintetizar um conjunto de cassetes degenerados, usando uma mistura de nucleosídios ativados em etapas particulares de síntese de oligonucleotídios. Suponha que a região codificadora de 30 pb comece com GTT, que codifica a valina. Se a mistura dos quatro nucleotídios é usada na primeira e na segunda etapa de síntese, o oligonucleotídio resultante começará com a sequência XYT (em que X e Y denotam A, C, G ou T). Estas 16 versões do cassete codificarão proteínas contendo Phe, Leu, Ile, Val, Ser, Pro, Thr, Ala, Tyr, His, Asn, Asp, Cis, Arg ou Gly na primeira posição. Da mesma maneira, cassetes degenerados podem ser feitos onde dois ou mais códons sejam simultaneamente variados.

9. Como a PCR pode amplificar quantidades tão pequenas quanto apenas uma molécula de DNA, alegações sobre o isolamento de DNA antigo precisam ser vistas com ceticismo. O DNA teria que ser sequenciado. Ele é similar ao humano, bacteriano ou de fungos? Se sim, a contaminação é a fonte mais provável do DNA amplificado. É semelhante ao de pássaros ou crocodilos? A similaridade da sequência pode fortalecer a alegação de que é um DNA de dinossauro, uma vez que estas espécies são evolutivamente mais próximas dos dinossauros.

10. A amplificação por PCR é muito prejudicada pela presença de regiões ricas em G-C no molde. Em função de suas elevadas temperaturas de desnaturação, estes moldes não desnaturam com facilidade, evitando a iniciação do ciclo de amplificação. Além disso, as estruturas secundárias rígidas inibem a DNA polimerase ao longo da fita molde durante o alongamento.

11. Em elevadas temperaturas de hibridização, apenas os pareamentos corretos entre o iniciador e o alvo seriam estáveis, uma vez que todas (ou a maioria) das bases deveriam encontrar parceiros para estabilizar a hélice de iniciador-alvo. À medida que a temperatura fosse abaixada, mais desencontros no pareamento seriam tolerados; assim é mais provável que a amplificação forneça genes que têm menor similaridade de sequência. Em relação ao gene de levedura, sintetize iniciadores correspondentes às extremidades do gene e então os use com o DNA humano como alvo. Se nada for amplificado a 54°C, o gene humano difere do gene de levedura, mas um correlato pode estar presente. Repita o experimento a uma temperatura de hibridização menor.

12. Processe o DNA genômico com uma enzima de restrição e selecione o fragmento que contenha a sequência conhecida. Circularize-o e então execute a PCR com o par de iniciadores que servem de molde para a síntese de DNA distante da sequência conhecida.

13. A proteína codificada contém quatro repetições de uma sequência específica.

14. Use a síntese química ou a reação em cadeia da polimerase para preparar sondas de hibridização que sejam complementares a ambas as extremidades do DNA conhecido (previamente isolado). Encontre os clones que representam a biblioteca de fragmentos de DNA com ambas as sondas de hibridização. Selecione os clones que hibridizaram com uma das sondas, mas não com a outra; tais clones são mais prováveis de representar os fragmentos de DNA que contêm uma extremidade do fragmento conhecido em conjunto com a região adjacente do cromossomo em particular.

O códon para cada aminoácido pode ser usado para determinar o número de possíveis sequências de nucleotídios que codificam cada sequência de peptídios (ver Tabela 4.5):

Ala–Met–Ser–Leu–Pro–Trp:
$4 \times 1 \times 6 \times 6 \times 4 \times 1$ = 576 sequências totais

Gly–Trp–Asp–Met–His–Lys:
$4 \times 1 \times 2 \times 1 \times 2 \times 2$ = 32 sequências totais

Cis–Val–Trp–Asn–Lys–Ile:
$2 \times 4 \times 1 \times 2 \times 2 \times 3$ = 96 sequências totais

Arg–Ser–Met–Leu–Gln–Asn:
$6 \times 6 \times 1 \times 6 \times 2 \times 2$ = 864 sequências totais

O conjunto de sequências de DNA codificando o peptídio Gly-Trp-Asp-Met-His-Lys seria o ideal para o projeto de uma sonda porque ele é feito por um total de apenas 32 oligonucleotídios.

16. Em uma espécie, cães individuais exibem enorme variação em tamanho corporal e diversidade substancial em outras características físicas. Desta maneira, a análise genômica dos cães individuais pode fornecer valiosas pistas sobre os genes responsáveis pela diversidade dentro de uma mesma espécie.

17. Com base no mapa comparativo genômico mostrado na Figura 5.27, a região de maior sobreposição com o cromossomo 20 é o cromossomo 2 do camundongo.

18. T_m é a temperatura de fusão de um ácido nucleico de fita dupla. Se as temperaturas de fusão dos iniciadores forem muito diferentes, a extensão da hibridização com o DNA-alvo será diferente durante a fase de pareamento, o que resultará em replicações diferentes das fitas.

19. A comparação cuidadosa das sequências revela que há uma região de complementaridade de 7 pb na extremidade 3' destes dois iniciadores:

```
5′-GGATCGATGCTCGCGA-3′
   | | | | | | |
3′-GAGCGCTGGGCTAGGA-5′
```

Em um experimento de PCR, estes iniciadores tenderiam a se parear um com o outro, impedindo sua interação com o DNA molde. Durante a síntese de DNA pela polimerase, cada iniciador agiria como um molde para o outro, levando à amplificação de uma sequência de 25 pb correspondente aos primers sobrepostos.

20. A mutação do indivíduo B alterou um dos alelos do gene X, deixando o outro intacto. O fato de que o alelo mutado é menor sugere que uma deleção ocorreu em uma cópia do gene. A cópia funcional é transcrita e traduzida e aparentemente produz proteína suficiente para que este indivíduo seja assintomático.

O indivíduo C tem apenas a pequena versão do gene. Este gene não é nem transcrito (*Northern blot* negativo) nem traduzido (*Western blot* negativo).

O indivíduo D tem uma cópia de tamanho normal do gene, mas não tem o RNA correspondente ou a proteína. Pode haver mutação na região promotora do gene que previna sua transcrição.

O indivíduo E tem uma cópia de tamanho normal do gene que é transcrita, mas nenhuma proteína é feita, o que sugere que há uma mutação que previne a tradução. Há um número de possíveis explicações, incluindo uma mutação que introduza um códon de parada prematuro no mRNA.

O indivíduo F tem a quantidade normal de proteína, mas ainda exibe o problema metabólico. Este dado sugere que a mutação afeta a atividade da proteína – por exemplo, uma mutação que compromete o sítio ativo da enzima Y.

21. Chongqing: resíduo 2, L → R, CTG → CGG

Karachi: resíduo 5, A → P, GCC → CCC

Swan River: resíduo 6, D → G, GAC → GGC

22. Esta pessoa em particular é heterozigota para esta mutação específica: um alelo é *selvagem* (normal), enquanto o outro porta uma mutação pontual nesta posição. Ambos os alelos são amplificados por PCR neste experimento, fornecendo a aparência de duplo pico no cromatograma de sequenciamento.

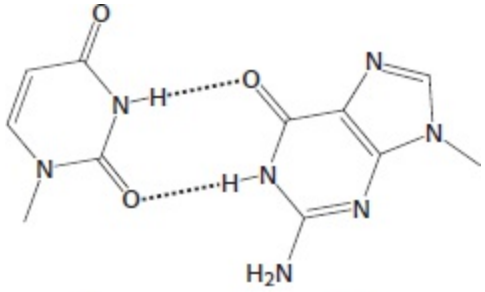
Capítulo 6

1. Existem 26 identidades e dois espaços (*gaps*) para um valor de 210. As duas sequências são aproximadamente 26% idênticas. É provável que esse nível de homologia seja estatisticamente significativo.

2. Essas duas proteínas estão provavelmente relacionadas por evolução divergente, visto que a estrutura tridimensional é mais conservada do que a identidade de sequência.

3. (a) Valor de identidade = –25; Pontuação de Blosum = 14: (b) valor de identidade = 15; Pontuação de Blosum = 3.

4. U



U G

5. Existem 4^{40} ou $1{,}2 \times 10^{24}$ moléculas diferentes. Cada molécula tem massa de $2{,}2 \times 10^{-20}$, visto que 1 mol de polímero tem massa de 330 g $mol^{-1} \times 40$ e existem $6{,}02 \times 10^{23}$ por mol. Por conseguinte, seriam necessários 26,4 kg de RNA.

6. Como a estrutura tridimensional está muito mais estreitamente associada à função do que à sequência, a estrutura terciária é mais conservada evolutivamente do que a estrutura primária. Em outras palavras, a função da proteína é a característica mais importante, e esta função é determinada pela estrutura. Por conseguinte, a estrutura precisa ser conservada, mas não necessariamente uma sequência específica de aminoácido.

7. O valor de alinhamento das sequências (1) e (2) é $6 \times 10 = 60$. Muitas respostas são possíveis, dependendo da sequência reordenada aleatoriamente. Um resultado possível é o seguinte:

Sequência embaralhada:	(2) TKADKAGEYL
Alinhamento:	(1) ASNFLDKAGK
	(2) TKADKAGEYL

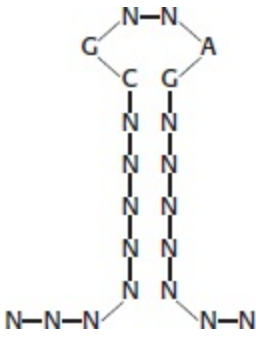
O valor de alinhamento é de $4 \times 10 = 40$.

8. (a) Quase certamente divergiram de um ancestral comum. (b) Quase certamente divergiram de um ancestral comum. (c) Podem ter divergido de um ancestral comum, porém o alinhamento de sequência pode não fornecer uma evidência confirmatória. (d) Podem ter divergido de um ancestral comum, mas é pouco provável que o alinhamento de sequência forneça uma evidência confirmatória.

9. A substituição de cisteína, glicina e prolina nunca produz uma pontuação positiva. Esses resíduos exibem características diferentes daquelas dos outros 19 aminoácidos: a cisteína é o único aminoácido capaz de formar ligações dissulfeto, a glicina é o único aminoácido sem cadeia lateral, e é altamente flexível, e a prolina é o único aminoácido que é fortemente restrito por meio da ligação de sua cadeia lateral a seu nitrogênio amina.

10. A proteína A é claramente homóloga à proteína B, tendo em vista uma identidade de sequência de 65%, e, assim, espera-se que A e B tenham estruturas tridimensionais muito semelhantes. De modo semelhante, as proteínas B e C são claramente homólogas, tendo em vista a sua identidade de sequência de 55%, e espera-se que essas duas proteínas tenham estruturas tridimensionais muito semelhantes. Por conseguinte, as proteínas A e C provavelmente apresentam estruturas tridimensionais semelhantes, embora sejam apenas 15% idênticas na sequência.

11. A estrutura secundária provável é



12. Para a detecção de pares de resíduos com mutações correlacionadas, é preciso haver variabilidade dessas sequências. Se o alinhamento for excessivamente representado por organismos estreitamente correlacionados, pode não haver mudanças suficientes nas suas sequências para possibilitar a identificação de padrões potenciais de pareamento de bases.

13. Após a seleção e a transcrição reversa das moléculas de RNA, efetua-se uma PCR para introduzir mutações adicionais nessas fitas. O uso dessa polimerase termoestável sujeita a erros na etapa de amplificação aumentará a eficiência dessa mutagênese aleatória.

14. O reservatório inicial de moléculas de RNA usado em um experimento de evolução molecular é tipicamente muito menor do que o número total de sequências possíveis. Por conseguinte, as sequências de RNA mais possíveis provavelmente não serão representadas no conjunto inicial de oligonucleotídios. A mutagênese das moléculas de RNA iniciais selecionadas possibilita uma melhora interativa dessas sequências para a propriedade desejada.

15. 107 ou 108 identidades (dependendo de qual sequência humana anotada for escolhida).

Capítulo 7

1. O cachalote nada por longas distâncias entre as respirações. Uma alta concentração de mioglobina no músculo do cachalote mantém pronto suprimento de oxigênio para os músculos entre as respirações.

2. (a) $2{,}96 \times 10^{-11}$ g

(b) $2{,}74 \times 10^{8}$ moléculas

(c) Não. Haveria $3{,}17 \times 10^{8}$ moléculas de hemoglobina em um eritrócito se fossem agrupadas em uma disposição cristalina cúbica. Por conseguinte, a verdadeira densidade de agregação é cerca de 84% do máximo possível.

3. 2,65 g (ou $4{,}75 \times 10^{-2}$ mol) de Fe

4. (a) Nos seres humanos, $1{,}44 \times 10^{-2}$ g ($4{,}49 \times 10^{-4}$ mol) de O_2 por quilograma de músculo. No cachalote, 0,144 g ($4{,}49 \times 10^{-3}$ mol) de O_2 por quilograma.

(b) 128

5. O valor de pK_a é (a) reduzido; (b) elevado; e (c) elevado.

6. A desoxi HbA contém um sítio complementar, de modo que ela pode se juntar a uma fibra de desoxi HbS. Em seguida, a fibra não é mais capaz de crescer, visto que a molécula terminal de desoxi HbA carece de um segmento aderente.

7. 62,7% da capacidade de transporte de oxigênio.

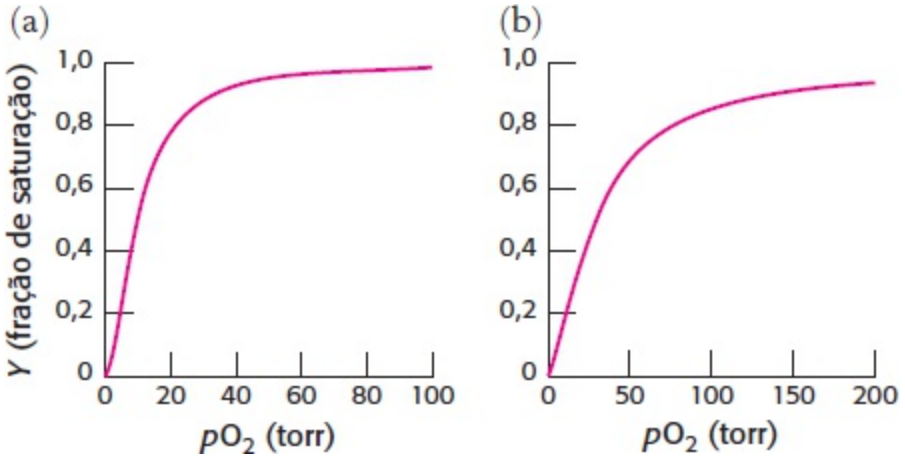
8. Uma concentração mais elevada de BPG deslocaria a curva de ligação do oxigênio para a direita, causando aumento de P_{50}. O valor mais alto de P_{50} promoveria a dissociação do oxigênio nos tecidos e, portanto, aumentaria a porcentagem de liberação de oxigênio aos tecidos.

9. A ligação do oxigênio parece fazer com que os íons de cobre e seus ligantes associados de histidina se movam, aproximando-se uns dos outros, o que resulta também no movimento das hélices às quais as histidinas estão ligadas (de modo semelhante às mudanças conformacionais na hemoglobina).

10. A hemoglobina modificada não deve exibir cooperatividade. Embora o imidazol em solução se ligue ao ferro do heme (em lugar da histidina) e facilite a ligação do oxigênio, o imidazol carece da conexão crucial com a a-hélice específica que deve se mover de modo a transmitir a mudança de conformação.

11. O inositol pentafosfato (parte c) é altamente aniônico, de modo muito semelhante ao 2,3-bifosfoglicerato.

12.



13. A liberação de ácido diminuir[a o pH. Um pH mais baixo promove a dissociação de oxigênio nos tecidos. Entretanto, a liberação aumentada de oxigênio nos tecidos aumentará a concentração de desoxi-Hb, aumentando, assim, a probabilidade de afoiçamento das células.

14. (a) $Y = 0{,}5$ quando $p_{O_2} = 10$ torr. O gráfico de Y *versus* p_{O_2} parece indicar pouca ou nenhuma cooperatividade.

(b) O traçado de Hill mostra uma ligeira cooperação com n : 1,3 na região central.

(c) Os dímeros desoxi da hemoglobina da lampreia podem ter menor afinidade pelo oxigênio do que os monômeros. Se a ligação do primeiro átomo de oxigênio a um dímero causar dissociação do dímero, produzindo dois monômeros, então o processo deve ser cooperativo. Nesse mecanismo, a ligação do oxigênio a cada monômero seria mais fácil do que a ligação do primeiro átomo de oxigênio ao dímero desoxi.

15. (a) 2; (b) 4; (c) 2; (d) 1.

16. As interações eletrostáticas entre o BPG e a hemoglobina seriam enfraquecidas pela competição com moléculas de água. O estado T não seria estabilizado.

Capítulo 8

1. Aumento da velocidade e especificidade de substrato.

2. Um cofator.

3. Coenzimas e metais.

4. As vitaminas são convertidas em coenzimas.

5. As enzimas facilitam a formação do estado de transição.

6. A complexa estrutura tridimensional das proteínas possibilita a formação de sítios ativos que reconhecerão apenas substratos específicos.

7. A energia necessária para alcançar o estado de transição (a energia de ativação) retorna quando o estado de transição prossegue para a formação do produto.

8. A hidrólise das proteínas tem uma grande energia de ativação. A síntese de proteína necessita de energia para a sua ocorrência.

9. As enzimas ajudam a proteger o líquido que circunda os olhos contra infecções bacterianas.

10. Os estados de transição são muito instáveis. Em consequência, as moléculas que se assemelham aos estados de transição também tendem a ser instáveis e, portanto, difíceis de sintetizar.

11. (a) 0; (b) 28,53; (c) –22,84; (d) –11,42; (e) 5,69.

12. (a) $\Delta G^{\circ\prime} = -RT \ln K'_{eq}$

$$+1{,}8 = -(1{,}98 \times 10^{-3}\ \text{kcal}^{-1}\ \text{K}^{-1}\ \text{mol}^{-1})\ (298\ \text{K})\ (\ln[\text{G1P}]/[\text{G6P}])$$

$$-3{,}05 = \ln [\text{G1P}]/[\text{G6P}]$$

$$+3{,}05 = \ln [\text{G6P}]/[\text{G1P}]$$

$$K'^{-1}_{eq} = 21 \quad \text{ou} \quad K'_{eq} = 4{,}8 \times 10^{-2}$$

Como [G6P]/[G1P] = 21, existe 1 molécula de G1P para cada 21 moléculas de G6P. Como iniciamos com 0,1 M, a [G1P] é de 1/22 (0,1 M) = 0,0045 M e a [G6P] deve ser de 21/22 (0,1 M) ou 0,096 M. Em consequência, a reação não ocorre em grau significativo como ela é escrita.

(b) Forneça G6P em alta velocidade e remova G1P em alta velocidade por outras reações. Em outras palavras, assegure que a [G6P]/[G1P] seja mantida grande.

13. $K_{eq} = 19$, $\Delta G^{\circ\prime} = -7{,}41$ kJ mol^{-1} (–1,77 kcal mol^{-1}).

14. A estrutura tridimensional de uma enzima é estabilizada por interações com o substrato, por intermediários da reação e pelos produtos. Essa estabilização minimiza a desnaturação térmica.

15. Com concentrações de substrato próximas ao K_M, a enzima apresenta catálise significativa; contudo, mostra-se sensível a mudanças na concentração de substrato.

16. A+ S = 10 K_M, $V_0 = 0{,}91\ V_{máx.}$ I + S = 20 K_M, $V_0 = 0{,}91\ V_{máx.}$ Por conseguinte, qualquer curva de Michaelis-Menten mostrando que a enzima realmente alcança a $V_{máx.}$ é uma mentira perniciosa.

17. (a) 31,1 µmol; (b) 0,05 µmol; (c) 622 s^{-1}, um valor na faixa média para as enzimas (ver Tabela 8.5).

18. (a) Sim, $K_M = 5{,}2 \times 10^{-6}$ M; (b) $V_{máx.} = 6{,}8 \times 10^{-10}$ mol minuto^{-1}; (c) 337 s^{-1}.

19. A penicilinase, à semelhança da glicopeptídio transpeptidase, forma um intermediário acil-enzima com o seu substrato, porém o transfere para a água, e não para o resíduo de glicina terminal da ponte de pentaglicina.

20. (a) A $V_{máx.}$ é de 9,5 μmol minuto^{-1}. K_M é de 1,1 × 10^{-5} M, o mesmo que na ausência de inibidor.

(b) Não competitiva.

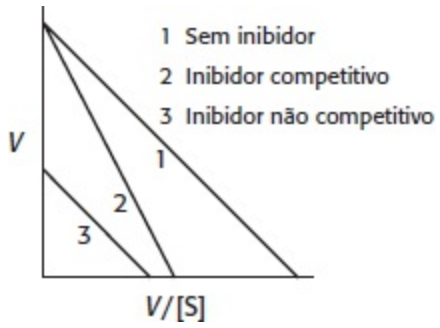
(c) 2,5 × 10^{-5} M

(d) f_{ES} = 0,73, na presença ou na ausência desse inibidor não competitivo.

21. (a) $V = V_{máx.} - (V/[S])\, K_M$.

(b) Inclinação = $-K_M$, interseção no $y = V_{máx.}$, interseção no $x = V_{máx.}/K_M$.

(c) Um gráfico de Eadie-Hofstee



22. As taxas de utilização dos substratos A e B são dadas por

$$V_A = \left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)_A [E][A]$$

e

$$V_A = \left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)_B [E][B]$$

Por conseguinte, a razão entre essas velocidades é

$$V_A/V_B = \left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)_B [A] / \left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)_A [B]$$

Assim, uma enzima discrimina entre substratos competidores com base nos seus valores de k_{cat}/K_M, e não apenas no valor de K_M.

23. A mutação retarda a reação por um fator de 100, visto que a energia livre de ativação é aumentada em 53,22 kJ mol^{-1} (12,72 kcal mol^{-1}). A ligação forte do substrato em relação ao estado de transição diminui a velocidade de catálise.

24. 1,1 μmol minuto^{-1}.

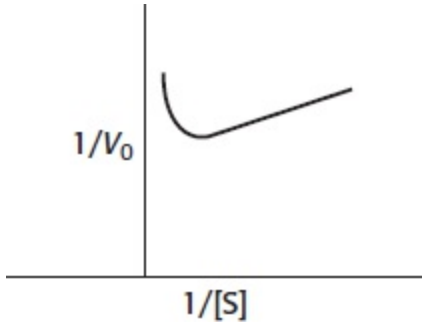
25. (a) Essa informação é necessária para determinar a dose correta de succinilcolina a ser administrada.

(b) A duração da paralisia depende da capacidade da colinesterase sérica de eliminar o fármaco. Se houvesse um oitavo da quantidade de atividade enzimática, a paralisia poderia durar oito vezes mais, que é uma duração indesejável por dois motivos. Primeiro, o respirador poderia apresentar problemas de funcionamento em virtude de seu uso prolongado, o que não seria bom para o paciente; segundo, os médicos poderiam perder a partida de golfe.

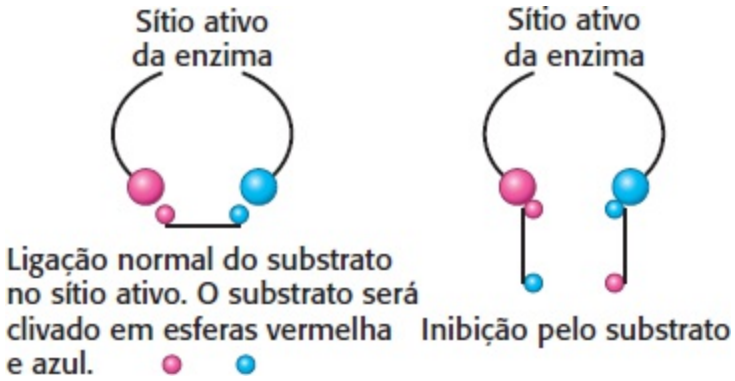
(c) O K_M é a concentração necessária para que a enzima alcance ½ $V_{máx.}$. Em consequência, para uma determinada concentração de substrato, a reação catalisada pela enzima com K_M menor terá maior velocidade. O paciente com a forma mutante com K_M mais alta eliminará o fármaco em uma velocidade muito mais lenta.

26. Se a quantidade total de enzima (E_T) aumentar, a $V_{máx.}$ aumentará, visto que $V_{máx.} = k_2[E_T]$. Entretanto, $K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$; isto é, independe da concentração de substrato. O gráfico do meio descreve essa situação.

27. (a)



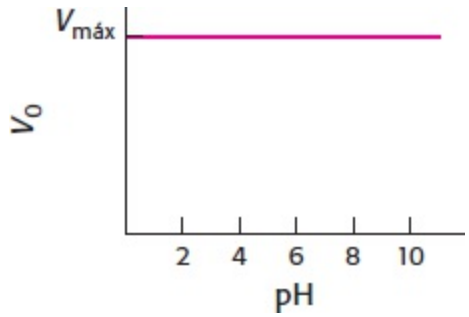
(b) Esse comportamento consiste em inibição pelo substrato: na presença de altas concentrações, o substrato forma complexos improdutivos no sítio ativo. O desenho anexo mostra o que poderia acontecer. O substrato liga-se normalmente em uma orientação definida, mostrada no desenho como vermelho para vermelho e azul para azul. Em altas concentrações, o substrato pode ligar-se ao sítio ativo, de modo que a orientação apropriada ocorre em cada extremidade da molécula, porém com ligação de duas moléculas diferentes de substrato.



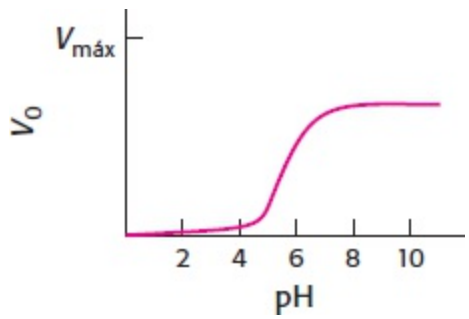
28. A primeira etapa será a etapa limitante da velocidade. As enzimas E_B e E_C são operantes em ½ $V_{máx.}$, enquanto o K_M para a enzima E_A é maior do que a concentração de substrato. E_A deverá operar em aproximadamente $10^{-2} V_{máx.}$.

29. A espectroscopia de fluorescência revela a existência de um complexo enzima-serina e de um complexo enzima-serina-indol.

30. (a) Quando $[S^+]$ for muito maior do que o valor de K_M, o pH terá um efeito desprezível sobre a enzima, visto que S^+ interagirá com E^- tão logo a enzima se torne disponível.



(b) Quando $[S^+]$ for muito menor do que o valor de K_M, o gráfico V_0 *versus* pH se tornará essencialmente uma curva de titulação para os grupos ionizáveis, sendo a atividade enzimática o marcador da titulação. Na presença de pH baixo, a alta concentração de H^+ manterá a enzima na forma EH inativa. À medida que o pH aumenta, uma quantidade cada vez maior da enzima estará na forma E^- e ativa. Na presença de pH alto (baixa concentração de H^+), toda a enzima será E^-.



(c) O ponto médio nesta curva será o pK_a do grupo ionizável, que se afirmou ser pH 6.

31. (a) A incubação da enzima a 37°C leva a uma desnaturação de sua estrutura e a uma perda de atividade. Por esse motivo, as enzimas precisam ser, em sua maioria, mantidas frias se não estiverem catalisando ativamente suas reações.

(b) A coenzima ajuda aparentemente a estabilizar a estrutura da enzima, visto que a enzima de células com deficiência de PLP sofre desnaturação mais rápida. Os cofatores frequentemente ajudam a estabilizar a estrutura das enzimas.

Capítulo 9

1. Para o substrato amida, a formação do intermediário acil-enzima é mais lenta do que a hidrólise desse intermediário, de modo que não se observa nenhum surto. Verifica-se a ocorrência de um surto para substratos éster; a formação do intermediário acil-enzima é mais rápida, levando ao surto observado.

2. O resíduo de histidina no substrato pode substituir, em certo grau, o resíduo de histidina ausente da tríade catalítica da enzima mutante.

3. Não. A tríade catalítica atua como unidade. Quando essa unidade se torna ineficaz pela mutação da histidina em alanina, a ocorrência de mutação adicional da serina em alanina tem apenas um pequeno efeito.

4. A substituição corresponde a uma das diferenças essenciais entre a tripsina e a quimiotripsina, de modo que é possível prever uma especificidade semelhante à da tripsina (clivagem após a lisina e a arginina). De fato, são necessárias alterações adicionais para efetuar essa mudança de especificidade.

5. Aparentemente, o imidazol é pequeno o suficiente para alcançar o sítio ativo da anidrase carbônica. Os tampões com grandes componentes moleculares não podem fazes isso, e os efeitos da mutação são mais evidentes.

6. Não. A probabilidade de essa sequência estar presente é de aproximadamente 1 em 4^{10} = 1.048.576. Como um genoma viral típico tem apenas 50.000 pb, é pouco provável que haja a sequência-alvo.

7. Não, uma vez que a enzima iria destruir o DNA do hospedeiro antes que pudesse ocorrer a metilação protetora.

8. Não. As bactérias que recebem a enzima teriam seu próprio DNA destruído, visto que elas provavelmente careceriam da metilase protetora adequada.

9. O EDTA irá se ligar ao Zn^{2+} e remover da enzima o íon, que é necessário para a atividade enzimática.

10. (a) O aldeído reage com a serina do sítio ativo. (b) Forma-se um hemiacetal.

11. Tripsina

12. Espera-se que a reação seja mais lenta por um fator de 10, visto que a velocidade depende do pK_a da água ligada ao zinco.

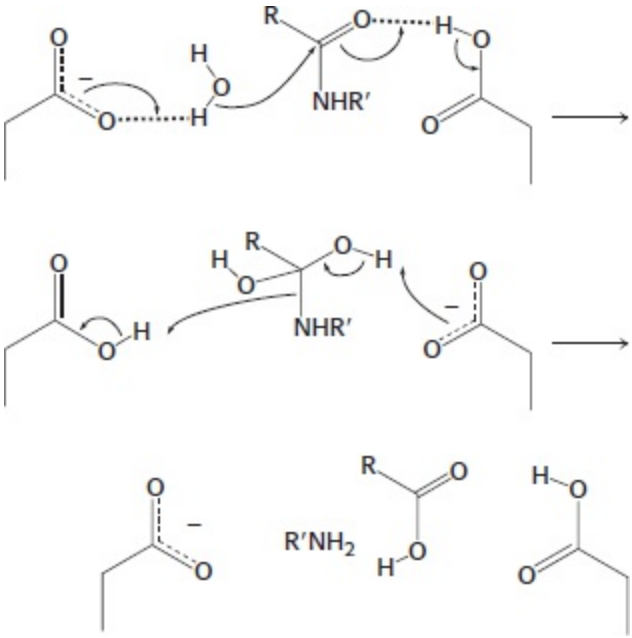
13. O EDTA liga-se ao magnésio necessário para a reação.

14. A hidrólise do ATP é reversível dentro do sítio ativo. A hidrólise do ATP ocorre dentro do sítio ativo com a incorporação de ^{18}O, o ATP é novamente formado, e ele é liberado de volta na solução.

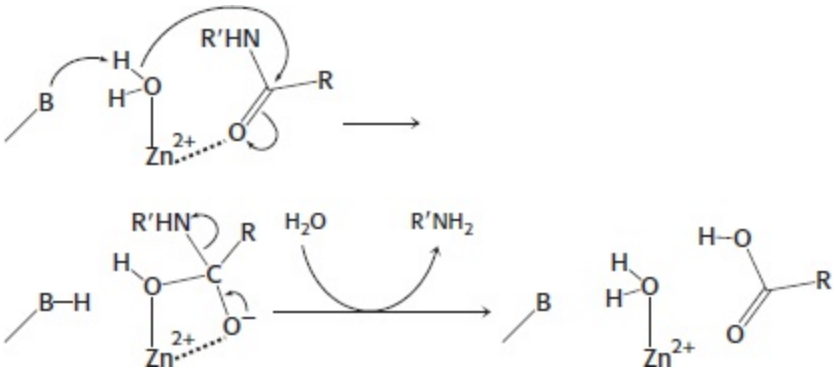
15. Se o aspartato for mutado, a protease será inativa, e o vírus não será viável.

16. A água substitui o grupo hidroxila da serina 236 na mediação da transferência de prótons de água de ataca e o grupo γ-fosforila.

17. (a) Cisteína protease: o mesmo que na Figura 9.8, exceto que a cisteína substitui a serina no sítio ativo e não há nenhum aspartato presente. (b) Aspartil protease:



(c) Metaloprotease:



Capítulo 10

1. A enzima catalisa a primeira etapa na síntese de pirimidinas. Ela facilita a condensação do carbamilfosfato e aspartato para formar *N*-carbamilaspartato e fosfato inorgânico.

2. A forma protonada da histidina provavelmente estabiliza o átomo de oxigênio carbonílico de carga negativa da ligação cindível no estado de transição. A desprotonação levaria a perda de atividade. Por conseguinte, espera-se que a velocidade seja a metade da velocidade máxima em um pH de cerca de 6,5 (o p*K* de uma cadeia lateral de histidina não perturbada em uma proteína) e que diminua à medida que o pH aumente.

3. A inibição de uma enzima alostérica pelo produto final da via controlada pela enzima. Impede a produção do produto final em quantidades excessivas e o consumo de substratos quando não há necessidade do produto.

4. O ATP em altas concentrações poderia sinalizar duas situações sobrepostas. Os altos níveis de ATP poderiam sugerir a disponibilidade de alguns *nucleotídios* para a síntese de ácidos nucleicos, e, consequentemente, ocorreria síntese de CTP. Os níveis elevados de ATP indicam a disponibilidade de *energia* para a síntese de ácidos nucleicos, de modo que haveria produção de CTP.

5. Toda a enzima estaria constantemente na forma R. Não haveria nenhuma cooperatividade. A cinética se assemelharia àquela de uma enzima de Michaelis-Menten.

6. A enzima exibiria uma cinética simples de Michaelis-Menten, visto que essencialmente está sempre no estado R.

7. A CTP é formada pela adição de um grupo amino à UTP. Há evidências de que a UTP também seja capaz de inibir a ATCase.

8. Os efetores homotrópicos são os substratos das enzimas alostéricas. Os efetores heterotrópicos são os reguladores das enzimas alostéricas. Os efetores homotrópicos são responsáveis pela natureza sigmoide da curva de velocidade *versus* concentração de substrato, enquanto os efetores heterotrópicos alteram o ponto médio de K_M da curva. Por fim, ambos os tipos de efetores atuam alterando a razão T/R.

9. A reconstituição mostra que a complexa estrutura quaternária e as propriedades catalíticas e regulatórias resultantes são, em última análise, codificadas na estrutura primária dos componentes individuais.

10. Se substratos tivessem sido utilizados, a enzima catalisaria a reação. Não haveria acúmulo de intermediários com a enzima. Consequentemente, qualquer enzima cristalizada teria ficado livre de substratos ou produtos.

11. (a) 100. A mudança na razão [R]/[T] com a ligação de uma molécula de substrato precisa ser a mesma que a razão das afinidades de substrato das duas formas.

(b) 10. A ligação de quatro moléculas de substrato modifica a [R]/[T] por um fator de $100^4 = 10^8$. A razão na ausência de substrato é de 10^{-7}. Por conseguinte, a razão na molécula totalmente ligada é de $10^8 \times 10^{-7} = 10$.

12. A fração de moléculas na forma R é de 10^{-5}, 0,004, 0,615, 0,998 e 1, quando ocorre ligação de 0, 1, 2, 3 e 4 ligantes, respectivamente.

13. O modelo sequencial pode explicar a cooperatividade negativa, mas não o modelo concertado.

14. A ligação do PALA modifica a ATCase, que passa do estado T para o estado R, visto que o PALA atua como análogo de substrato. Uma molécula de enzima contendo PALA ligado tem menos sítios catalíticos livres do que uma molécula de enzima não ocupada. Entretanto, a enzima que contém PALA estará no estado R e, portanto, terá maior afinidade pelos substratos. A dependência da concentração de PALA para o grau de ativação constitui uma função complexa da constante alostérica L_0 e das afinidades de ligação dos estados R e T para o análogo e para os substratos.

15. O resultado final das duas reações consiste na hidrólise do ATP a ADP e P_i, que tem um ΔG de –50 kJ mol^{-1} (–12 kcal mol^{-1}) em condições celulares.

16. As isoenzimas ou isozimas são enzimas homólogas, que catalisam a mesma reação, mas que apresentam diferentes propriedades cinéticas ou reguladoras.

17. Embora a mesma reação possa ser necessária em uma variedade de tecidos diferentes, as propriedades bioquímicas dos tecidos diferem de acordo com a sua função biológica. As isoenzimas possibilitam o controle fino das propriedades catalíticas e reguladoras para atender às necessidades específicas do tecido.

18. (a) 7; (b) 8; (c) 11; (d) 6; (e) 1; (f) 12; (g) 3; (h) 4; (i) 5; (j) 2; (k) 10; (l) 9.

19. Quando a fosforilação ocorre à custa de ATP, uma quantidade suficiente de energia é consumida para alterar drasticamente a estrutura e, consequentemente, a atividade de uma proteína. Além disso, como o ATP é a forma universal de energia celular, a modificação das proteínas está ligada ao estado energético da célula.

20. A modificação covalente é reversível, enquanto a clivagem proteolítica é irreversível.

21. A ativação é independente da concentração de zimogênio, visto que a reação é intramolecular.

22. Embora sejam muito raros, foram relatados casos de deficiência de enteropeptidase. O indivíduo afetado apresenta diarreia e não se desenvolve, visto que o processo de digestão é inadequado. Em particular, ocorre comprometimento da digestão de proteínas.

23. Adicione sangue do segundo paciente a uma amostra do primeiro. Se a mistura coagular, significa que o segundo paciente tem um defeito diferente do primeiro. Esse tipo de ensaio é denominado teste de complementação.

24. O fator X ativado permanece ligado às membranas das plaquetas, o que acelera a sua ativação da protrombina.

25. A antitrombina III é um substrato da trombina, que é hidrolisado muito lentamente. Por conseguinte, a sua interação com a trombina exige um sítio ativo totalmente formado na enzima.

26. Os resíduos *a* e *d* estão localizados no interior de uma α-hélice espiralada, próximo ao eixo da super-hélice. As interações hidrofóbicas entre essas cadeias laterais contribuem para a estabilidade da super-hélice.

27. A leucina seria uma boa escolha. Ela é resistente à oxidação e apresenta o mesmo volume e grau de hidrofobicidade que a metionina.

28. A formação inadequada de coágulos bloquearia as artérias no cérebro, causando acidente vascular encefálico, ou no coração, causando ataque cardíaco.

29. O ativador do plasminogênio tecidual ou TPA é uma serina protease, que leva à dissolução dos coágulos sanguíneos. O TPA ativa o plasminogênio que está ligado ao coágulo de fibrina, convertendo-o em plasmina ativa, que então hidrolisa a fibrina do coágulo.

30. Um coágulo maduro é estabilizado por ligações amídicas entre as cadeias laterais da lisina e da glutamina que estão ausentes no coágulo mole. As ligações são formadas pela transglutaminase.

31. Um modelo sequencial simples prevê que a fração de cadeias catalíticas no estado R, f_R, é igual à fração contendo o substrato ligado, *Y*. Em contrapartida, o modelo concertado prevê que f_R aumenta mais rapidamente do que *Y* à medida que a concentração do substrato aumenta. A mudança de f_R leva à alteração de *Y* com a adição de substrato, conforme previsto pelo modelo concertado.

32. A ligação de succinato aos sítios catalíticos funcionais da fração c_3 nativa modificou o espectro de absorção visível dos resíduos de

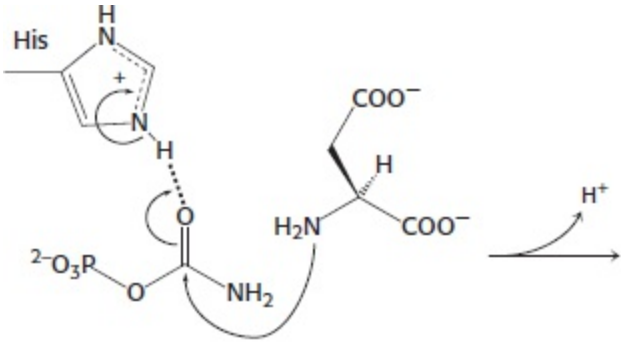
nitrotirosina na *outra* fração c_3 da enzima híbrida. Por conseguinte, a ligação do análogo do substrato aos sítios ativos de um trímero alterou a estrutura do outro trímero.

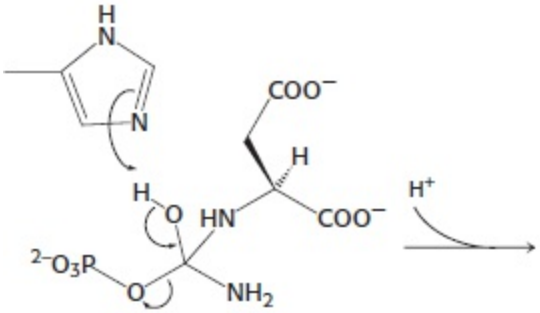
33. De acordo com o modelo concertado, um ativador alostérico desloca o equilíbrio de conformação de todas as subunidades para o estado R, enquanto um inibidor alostérico o desloca para o estado T. Por conseguinte, o ATP (um ativador alostérico) desviou o equilíbrio para a forma R, resultando em mudança de absorção semelhante àquela obtida quando o substrato está ligado. A CTP tem um efeito diferente. Por conseguinte, esse inibidor alostérico desviou o equilíbrio para a forma T. Assim, o modelo concertado explica as interações alostéricas da ATCase induzidas pelo ATP e pela CTP (heterotrópicas), bem como aquelas induzidas pelo substrato (homotrópicas).

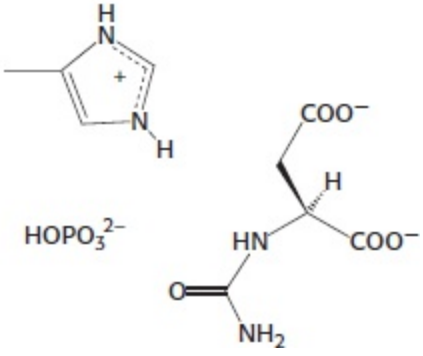
34. No estado R, a ATCase se expande e torna-se menos densa. Essa diminuição de densidade resulta em redução do valor de sedimentação (ver fórmula na p. 78).

35. A interação entre a tripsina e o inibidor é tão estável que o estado de transição é raramente formado. Convém lembrar que a energia de ligação máxima é liberada quando uma enzima se liga ao estado de transição. Quando a interação substrato-enzima é demasiadamente estável, o estado de transição raramente se forma.

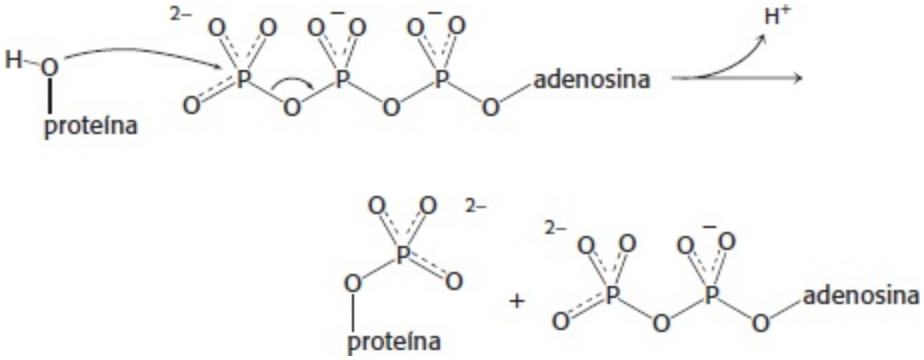
36.







37.



Capítulo 11

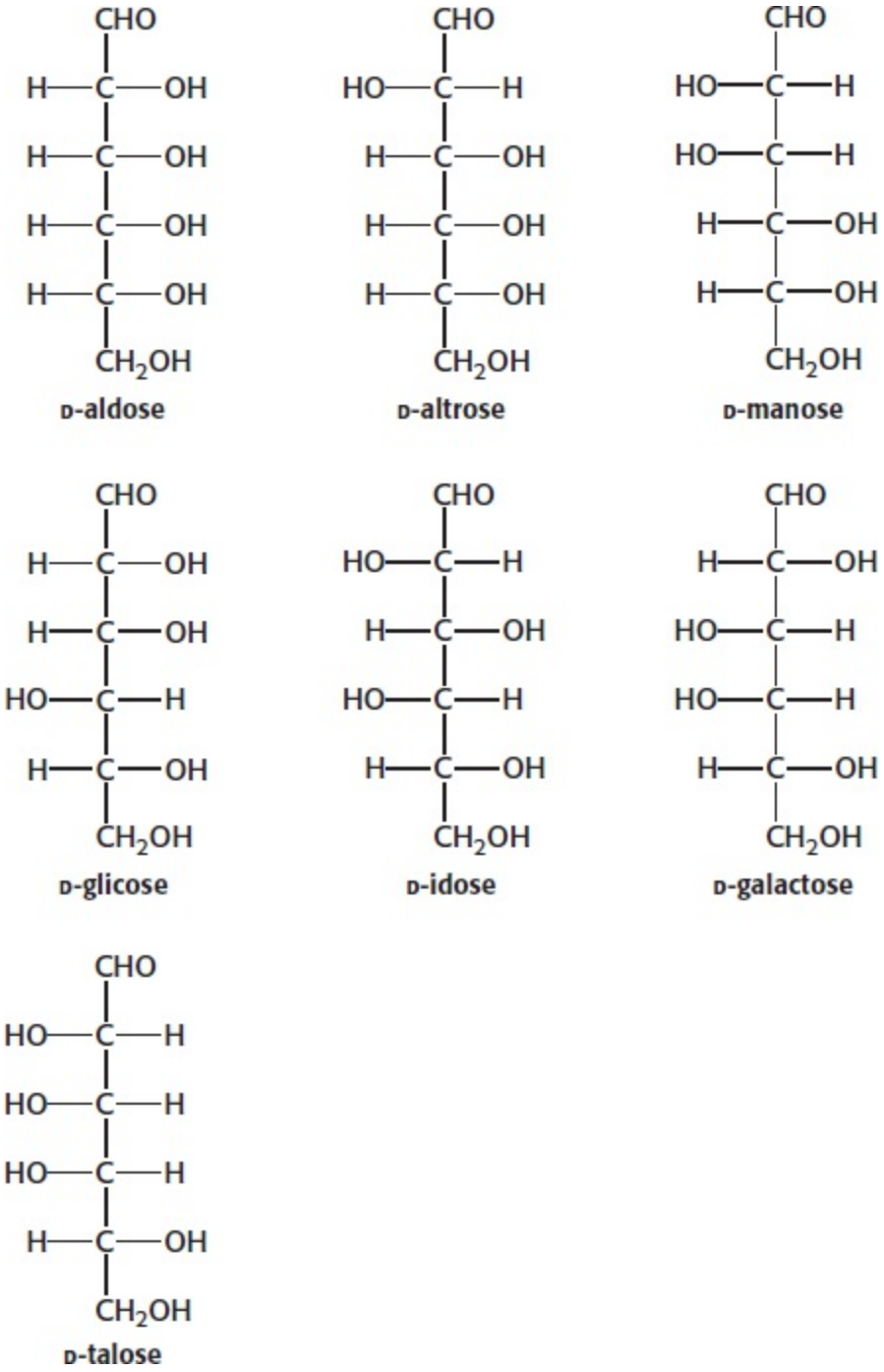
1. Os carboidratos eram originalmente considerados como *hidratos de carbono,* visto que a fórmula empírica de muitos deles é $(CH_2O)_n$.

2. Três aminoácidos podem ser unidos por ligações peptídicas em apenas seis modos diferentes. Entretanto, três monossacarídios diferentes podem ser unidos de inúmeras maneiras. Os monossaca-rídios podem ligar-se de modo linear ou ramificado, com ligações α ou β, como ligações entre C-1 e C-3, entre C-1 e C-4, entre C-1 e C-6, e assim por diante. Na verdade, os três monossacarídios podem formar 12.288 trissacarídios diferentes.

3. (a) aldose-cetose; (b) epímeros; (c) aldose-cetose; (d) anômeros; (e) aldose-cetose; (f) epímeros.

4. Eritrose: tetrose aldose; ribose: pentose aldose; gliceraldeído: triose aldose; di-hidroxiacetona: triose cetose; eritrulose: tetrose cetose; ribulose: pentose cetose; frutose: hexose cetose.

5.



6. A proporção do anômero α é 0,36 e a do anômero β é 0,64.

7. A glicose é reativa devido à presença de um grupo aldeído em sua forma de cadeia aberta. O grupo aldeído condensa-se lentamente com grupos amino para formar produtos aldimina denominados produtos de adição de base de Schiff.

8. Um piranosídio reage com duas moléculas de periodato; o formato é um dos produtos. Um furanosídio reage com apenas uma molécula de periodato; não há formação de formato.

9. Provém do metanol.

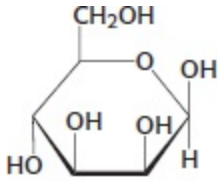
10. (a) β-D-manose; (b) β-D-galactose; (c) β-D-frutose; (d) β-Dglicosamina.

11. O próprio trissacarídio seria um inibidor competitivo da adesão celular se a unidade trissacarídica da glicoproteína fosse essencial para a interação.

12. As extremidades redutoras formariam 1,2,3,6-tetrametilglicose. Os pontos de ramificação formariam 2,3-dimetilglicose. O restante da molécula produziria 2,3,6-trimetilglicose.

13. (a) Não é um açúcar redutor; não é possível a formação de cadeia aberta. (b) D-galactose, D-glicose, D-frutose. (c) D-galactose e sacarose (glicose mais frutose).

14. A ligação hemicetal do anômero α é rompida para gerar a formar aberta. A rotação ao redor das ligações de C-1 e C-2 possibilita a formação do anômero β, resultando em uma mistura de isômeros.



β-D-manose

15. O aquecimento converte a forma piranose muito doce na forma furanose mais estável, porém de sabor menos doce. Consequentemente, é difícil controlar acuradamente o sabor doce da preparação, o que também explica por que o mel perde o seu sabor doce com o passar do tempo. Ver as estruturas na Figura 11.5.

16. (a) Cada molécula de glicogênio tem uma extremidade redutora, enquanto o número de extremidades não redutoras é determinado pelo número de ramificações ou ligações α-1,6. (b) Como o número de extremidades não redutoras ultrapassa acentuadamente o número de extremidades redutoras em um número de moléculas de glicogênio, toda degradação e síntese de glicogênio ocorrem nas extremidades não redutoras, maximizando a velocidade de degradação e de síntese.

17. Não, a sacarose não é um açúcar redutor. O átomo de carbono anomérico atua como agente redutor tanto na glicose quanto na frutose; entretanto, na sacarose, os átomos de carbono anoméricos da frutose e da glicose são unidos por uma ligação covalente, e, portanto, não estão disponíveis para reagir.

18. O glicogênio é um polímero de glicose unido por ligações α-1, 4-glicosídicas, com ramificações formadas aproximadamente a cada 10 unidades de glicose por ligações α-1,6-glicosídicas. O amido é constituído de dois polímeros de glicose. A amilose é um polímero de cadeia retilínea formado por ligações α-1,4-glicosídicas. A amilopeptina assemelha-se ao glicogênio, porém tem menos ramificações, com uma ramificação a cada 30 ou mais unidades de glicose.

19. A celulose é um polímero linear de glicose, em que as unidades de glicose são unidas por ligações β-1,4. O glicogênio é um polímero ramificado, sendo a principal cadeia formada por ligações α-1,4-glicosídicas. As ligações β-1,4 possibilitam a formação de um polímero linear ideal para funções estruturais. As ligações α-1,4 do glicogênio formam uma estrutura helicoidal, que possibilita o armazenamento de muitas unidades de glicose em um pequeno espaço.

20. As glicoproteínas simples são frequentemente proteínas secretadas e, portanto, desempenham uma variedade de papéis. Por exemplo, o hormônio EPO é uma glicoproteína. Em geral, a proteína componente constitui a maior parte da glicoproteína por massa. Em contrapartida, os proteoglicanos e as mucoproteínas são predominantemente carboidratos. Os proteoglicanos apresentam glicosaminoglicanos fixados e desempenham funções estruturais, como na cartilagem e na matriz extracelular. As mucoproteínas frequentemente atuam como lubrificantes e apresentam múltiplos carboidratos unidos por uma fração *N*-acetilgalactosamina.

21. A ligação do carboidrato possibilita a permanência da EPO na circulação por mais tempo e, portanto, a sua ação por períodos mais longos de tempo do que uma EPO que não tivesse carboidrato.

22. O glicosaminoglicano, em virtude de sua acentuada carga, ligase a muitas moléculas de água. Quando a cartilagem é submetida ao estresse, como no momento em que o calcanhar entra em contato com o solo, a água é liberada, amortecendo, assim, o impacto. Quando o calcanhar é elevado, a água volta a se ligar.

23. A lectina que se liga à manose 6-fosfato poderia estar deficiente e não reconhecer uma proteína corretamente endereçada.

24. Diferentes formas moleculares de uma glicoproteína que diferem na quantidade de carboidrato ligado ou na localização da ligação, ou ambas.

25. O conjunto total de carboidratos sintetizados por uma célula em determinados momentos e em condições ambientais particulares.

26. O genoma compreende todos os genes presentes em um organismo. O proteoma inclui todas as proteínas possíveis e proteínas modificadas que uma célula expressa em determinado conjunto de circunstâncias. O glicoma é constituído por todos os carboidratos sintetizados pela célula em qualquer conjunto determinado de circunstâncias. Como o genoma é estático, enquanto qualquer proteína pode ser variadamente expressa e modificada, o proteoma é mais complexo do que o genoma. O glicoma, que inclui não apenas as glicoformas das proteínas, mas também numerosas estruturas possíveis de carboidratos, deve ser ainda mais complexo.

27. Sugere que os carboidratos se encontram na superfície celular de todos os organismos para o propósito de reconhecimento por outros organismos ou reconhecimento do ambiente.

28. Uma glicoproteína é uma proteína decorada com carboidratos. Uma lectina é uma proteína que reconhece especificamente carboidratos. Uma lectina também pode ser uma glicoproteína.

29. Cada sítio é ou não glicosilado, de modo que existem $2^6 = 64$ proteínas possíveis.

30. Conforme discutido no Capítulo 9, muitas enzimas exibem especificidade estereoquímica. Evidentemente, as enzimas envolvidas na

síntese de sacarose são capazes de distinguir os isômeros dos substratos e ligar-se apenas ao par correto.

31. Se a especificidade da lectina por carboidratos for conhecida, pode-se preparar uma coluna de afinidade com o carboidrato apropriado ligado. A preparação de proteína contendo a lectina em questão poderia ser passada pela coluna. Foi com esse método, na verdade, que a concanavalina A, a lectina de ligação da glicose, foi purificada.

32. (a) O agrecano é intensamente decorado com glicosaminoglicanos. Se glicosaminoglicanos forem liberados no meio, o agrecano deve sofrer degradação.

(b) Outra enzima poderia estar presente clivando os glicosaminoglicanos, sem degradá-la. Outros experimentos não mostrados estabeleceram que a liberação de glicosaminoglicanos constitui medida acurada da destruição do agrecano.

(c) O controle fornece uma base para a degradação "basal" inerente ao ensaio.

(d) A degradação de agrecano é acentuadamente aumentada.

(e) A degradação de agrecano é reduzida ao nível basal.

(f) Trata-se de um sistema *in vitro* no qual nem todos os fatores que contribuem para a estabilização da cartilagem *in vivo* estão presentes.

Capítulo 12

1. $2{,}86 \times 10^6$ moléculas, visto que cada folheto da bicamada contém $1{,}43 \times 10^6$ moléculas.

2. Essencialmente uma membrana "virada do avesso". Os grupos hidrofílicos se uniriam no interior da estrutura, distantes do solvente, enquanto as cadeias hidrocarbonadas interagiriam com o solvente.

3. 2×10^{-7} cm, 6×10^{-6} cm e 2×10^{-4} cm.

4. O raio dessa molécula é de $3{,}1 \times 10^{-7}$ cm, e o seu coeficiente de difusão $7{,}4 \times 10^{-9}$ $cm^2\ s^{-1}$. As distâncias médias percorridas são de $1{,}7 \times 10^{-7}$ cm em 1 μs, $5{,}4 \times 10^{-6}$ cm em 1 ms, e de $1{,}7 \times 10^{-4}$ cm em 1 s.

5. A membrana sofreu uma transição de fase de um estado altamente fluido para um estado quase congelado quando a temperatura foi reduzida. Um carreador só pode transportar íons através de uma membrana quando uma camada é altamente fluida. Em contrapartida, um canal permite que os íons atravessem o seu poro, mesmo quando a bicamada é muito rígida.

6. A presença de uma dupla ligação cis introduz uma dobra na cadeia de ácido graxo que impede o acondicionamento e reduz o número de átomos com contato de van der Waals. A dobra diminui o ponto de fusão em comparação com o ácido graxo saturado. Os ácidos graxos trans não apresentam a dobra, de modo que suas temperaturas de fusão são mais altas e mais semelhantes àquelas dos ácidos graxos saturados. Como os ácidos graxos trans não têm efeito estrutural, são raramente observados.

7. O ácido palmítico é mais curto do que o ácido esteárico. Por conseguinte, quando as cadeias se unem, há menos oportunidade de interação de van der Waals, e o ponto de fusão é, portanto, mais baixo que o do ácido esteárico mais longo.

8. Os animais hibernantes alimentam-se seletivamente de plantas que apresentam maior proporção de ácidos graxos poli-insaturados com temperatura de fusão mais baixa.

9. A diminuição inicial da fluorescência com a primeira adição de ditionita de sódio resulta da extinção nas moléculas de NBD-PS no folheto externo da bicamada. A ditionita de sódio não atravessa a membrana nessas condições experimentais; por conseguinte, ela não reduz os fosfolipídios marcados no folheto interno. A segunda adição de ditionita de sódio não tem nenhum efeito, visto que as moléculas de NBD-PS no folheto externo permanecem extintas. Entretanto, depois de uma incubação de 6,5 h, cerca de 50% das moléculas de NBD-PS sofreram difusão transversa para o folheto externo da bicamada, resultando em redução de 50% da fluorescência com a adição de ditionita de sódio.

10. A adição do carboidrato introduz uma barreira energética significativa contra *flip-flop,* visto que seria necessário o deslocamento da unidade de carboidrato hidrofílico através de um ambiente hidrofóbico. Essa barreira energética intensifica a assimetria da membrana.

11. A cadeia alquila C_{16} está ligada por uma ligação éter. O átomo de carbono C-2 do glicerol tem apenas um grupo acetila ligado por uma ligação éster, em lugar de um ácido graxo, conforme observado na maioria dos fosfolipídios.

12. Em um ambiente hidrofóbico, a formação de pontes de hidrogênio intracadeias estabiliza os átomos de hidrogênio das amidas e os átomos de oxigênio carbonílicos da cadeia polipeptídica, com consequente formação de uma α-hélice. Em um ambiente aquoso, esses grupos são estabilizados pela sua interação com água; por conseguinte, não existe nenhum motivo energético para a formação de uma α-hélice. Dessa maneira, a α-hélice teria mais tendência a se formar em um ambiente hidrofóbico.

13. A proteína pode conter uma α-hélice que passa através do cerne hidrofóbico da proteína. Essa hélice tende a exibir um segmento de aminoácidos hidrofóbicos semelhantes àqueles observados nas hélices transmembranares.

14. O deslocamento para a temperatura mais baixa diminuiria a fluidez, aumentando o acondicionamento das cadeias hidrofóbicas por interações de van der Waals. Para impedir esse acondicionamento, seriam sintetizados novos fosfolipídios apresentando cadeias mais curtas e um número maior de duplas ligações em cis. As cadeias mais curtas reduziriam o número de interações de van der Waals, e as duplas ligações em cis, o que provocaria a dobra na estrutura, impedindo o acondicionamento das caudas de ácidos graxos dos fosfolipídios.

15. Cada uma das 21 proteínas v-SNARE poderia interagir com cada uma das 7 proteínas parceiras t-SNARE. A multiplicação fornece o número total de diferentes pares de interação: $7 \times 21 = 147$ pares diferentes de v-SNARE–t-SNARE.

16. (a) O gráfico mostra que, à medida que aumenta a temperatura, a bicamada fosfolipídica torna-se mais fluida. T_m é a temperatura de transição do estado predominantemente menos fluido para o estado predominantemente mais fluido. O colesterol alarga essa transição do estado menos fluido para o mais fluido. Em essência, o colesterol torna a fluidez da membrana menos sensível a mudanças de temperatura. (b) Esse efeito é importante, visto que a presença de colesterol tende a estabilizar a fluidez da membrana ao impedir transições abruptas. Como a função das proteínas depende da fluidez adequada da membrana, o colesterol mantém o ambiente apropriado para a função das proteínas de membrana.

17. A proteína representada graficamente na parte C é uma proteína transmembranar de *C. elegans*. Ela atravessa a membrana com quatro α-hélices que aparecem proeminentemente como picos hidrofóbicos no gráfico de hidropatia. É interessante assinalar que a proteína representada graficamente na parte A também é uma proteína de membrana, uma porina. Essa proteína é constituída principalmente de fitas β, que carecem da janela hidrofóbica proeminente das hélices de membrana. Esse exemplo mostra que os gráficos de hidropatia, apesar de sua utilidade, não são infalíveis.

18. Para purificar qualquer proteína, ela precisa ser inicialmente solubilizada. Para uma proteína de membrana, a solubilização habitualmente exige um detergente – moléculas hidrofóbicas que se ligam à proteína e, portanto, substituem o ambiente lipídico da membrana. Se o detergente for removido, a proteína se agregará e se precipitará da solução. Com frequência, é difícil efetuar as etapas de purificação, como a cromatografia de troca iônica, na presença de detergente suficiente para solubilizar a proteína. É necessária a formação de cristais de complexos apropriados de proteína com detergente.

Capítulo 13

1. Na difusão simples, a substância em questão pode se difundir ao longo de seu gradiente de concentração através da membrana. Na difusão facilitada, a substância não é lipofílica e não pode se difundir diretamente através da membrana. É necessário um canal ou um carreador para facilitar o movimento ao longo do gradiente.

2. As duas formas são (1) a hidrólise do ATP e (2) o movimento de uma molécula ao longo de seu gradiente de concentração acoplado ao movimento de outra molécula contra o seu gradiente de concentração.

3. Os três tipos de carreadores são os simportadores, os antiportadores e os uniportadores. Os simportadores e os antiportadores podem mediar o transporte ativo secundário.

4. O custo de energia livre é de 32 kJ mol^{-1} (7,6 kcal mol^{-1}). O trabalho químico executado é de 20,4 kJ mol^{-1} (4,9 kcal mol^{-1}), e o trabalho elétrico realizado é de 11,5 kJ mol^{-1} (2,8 kcal mol^{-1}).

5. Para o cloreto, $z = -1$; para cálcio $z = +2$. Nas concentrações fornecidas, o potencial de equilíbrio para o cloreto é de –97 mV, enquanto o potencial de equilíbrio para o cálcio é de +122 mV.

6. A concentração de glicose dentro da célula é 66 vezes maior que a concentração fora da célula $[(c_2/c_1) = 66]$ quando a entrada de energia livre é de 10,8 kJ mol^{-1} (2,6 kcal mol^{-1}).

7. Por analogia com a Ca^{2+} ATPase, com a ligação de três íons Na^+ de dentro da célula na conformação E_1 e com a ligação de dois íons K^+ de fora da célula na conformação E_2, um mecanismo plausível é o seguinte:

(i) O ciclo catalítico deve começar com a enzima em seu estado não fosforilado (E_1) com três íons sódio ligados.

(ii) A conformação E_1 liga-se ao ATP. Uma mudança de conformacional aprisiona os íons sódio dentro da enzima.

(iii) O grupo fosforila é transferido do ATP para um resíduo aspartil.

(iv) Com a liberação de ADP, a enzima modifica a sua conformação global, incluindo o domínio de membrana. Essa nova conformação (E_2) libera os íons sódio para o lado da membrana oposto àquele em que eles entraram e liga-se a dois íons potássio do lado em que os íons sódio foram liberados.

(v) O resíduo de fosforil aspartato é hidrolisado, liberando fosfato inorgânico. Com a liberação de fosfato, são perdidas as interações estabilizadoras de E_2, e a enzima retorna à conformação E_1. Os íons potássio são liberados no lado citoplasmático da membrana. A ligação de três íons sódio a partir do lado citoplasmático da membrana completa o ciclo.

8. Estabelecer um gradiente de lactose através das membranas de vesículas que contêm lactose permease apropriadamente orientada.

No início, o pH deveria ser o mesmo em ambos os lados da membrana, e a concentração de lactose seria mais alta no lado de "saída" da lactose permease. À medida que a lactose flui "no sentido inverso" através da permease, ao longo de seu gradiente de concentração, pode-se testar se um gradiente de pH irá ou não se estabelecer à medida que o gradiente de lactose é dissipado.

9. Os canais regulados por ligantes abrem-se em resposta à ligação de uma molécula pelo canal, enquanto os canais regulados por voltagem abrem-se em resposta a variações no potencial de membrana.

10. Um canal iônico deve transportar íons em ambos os sentidos na mesma velocidade. O fluxo efetivo de íons é determinado apenas pela composição das soluções em ambos os lados da membrana.

11. Os uniportadores atuam como enzimas; seus ciclos de transporte incluem grandes mudanças conformacionais, e apenas algumas moléculas interagem com a proteína por ciclo de transporte. Em contrapartida, os canais, após a sua abertura, apresentam um poro na membrana através do qual podem passar muitos íons. Assim, os canais medeiam o transporte em uma velocidade muito maior do que os uniportadores.

12. O FCCP cria efetivamente um poro na membrana bacteriana através do qual os prótons podem passar rapidamente. Os prótons que são bombeados para fora da bactéria irão passar preferencialmente por esse poro ("o caminho de menor resistência") em vez de participar no simporte de H^+/lactose.

13. O músculo cardíaco precisa se contrair de modo altamente coordenado para bombear efetivamente o sangue. As junções comunicantes (*gap junctions*) medeiam a propagação ordenada do potencial de ação de uma célula para outra através do coração durante cada batimento.

14. O grupo guanidínio de carga positiva assemelha-se ao Na^+ e liga-se a grupos carboxilato de carga negativa na abertura de canal.

15. A SERCA, uma ATPase do tipo P, utiliza um mecanismo pelo qual há formação de um intermediário fosforilado covalente (em um resíduo de aspartato). No estado de equilíbrio dinâmico, um subgrupo das moléculas SERCA é aprisionado no estado E_2-P e, como consequência, marcado radioativamente. A proteína MDR é um transportador ABC e não opera por meio de um intermediário fosforilado. Por conseguinte, não será observada uma banda marcada radioativamente no caso da proteína MDR.

16. O bloqueio dos canais iônicos inibe os potenciais de ação, levando à perda da função nervosa. À semelhança da tetrodotoxina, essas moléculas e toxinas são úteis para isolar e inibir especificamente determinados canais iônicos.

17. Após a repolarização, os domínios em bola dos canais iônicos ocupam o poro do canal, tornando-os inativos por um curto período de tempo. Nesse intervalo, os canais não podem ser reabertos, até que os domínios em bola saem, e o canal retorne ao estado "fechado".

18. Como os íons sódio têm carga elétrica, e como os canais de sódio só transportam íons sódio (mais não ânions), o acúmulo de carga positiva em excesso em um lado da membrana domina os gradientes químicos.

19. Uma mutação que compromete a capacidade de inativação do canal de sódio prolongaria a duração da corrente despolarizante de sódio, aumentado, assim, o potencial de ação cardíaco.

20. Não. Os canais provavelmente irão se abrir ou fechar em resposta a um estímulo externo, porém a condutância unitária do canal aberto será muito pouco influenciada.

21. A razão entre formas fechada e aberta do canal é 10^5, 5.000, 250, 12,5 e 0,625 quando, respectivamente, 0, 1, 2, 3 e 4 ligantes estão ligados. Por conseguinte, a fração de canais abertos é de $1{,}0 \times 10^{-5}$, $2{,}0 \times 10^{-4}$, $4{,}0 \times 10^{-3}$, $7{,}4 \times 10^{-2}$ e 0,62.

22. Esses fosfatos orgânicos inibem a acetilcolinesterase ao reagir com o resíduo de serina do sítio ativo, formando um derivado fosforilado estável. Provocam paralisia respiratória ao bloquearem a transmissão sináptica nas sinapses colinérgicas.

23. (a) A ligação da primeira molécula de acetilcolina aumenta a razão entre aberto e fechado por um fator de 240, enquanto a ligação da segunda aumenta a razão por um fator de 11.700. (b) As contribuições da energia livre são de 14 kJ mol^{-1} (3,3 kcal mol^{-1}) e 23 kJ mol^{-1} (5,6 kcal mol^{-1}), respectivamente. (c) Não. O modelo MWC prevê que a ligação de cada ligante terá o mesmo efeito sobre a razão entre aberto e fechado.

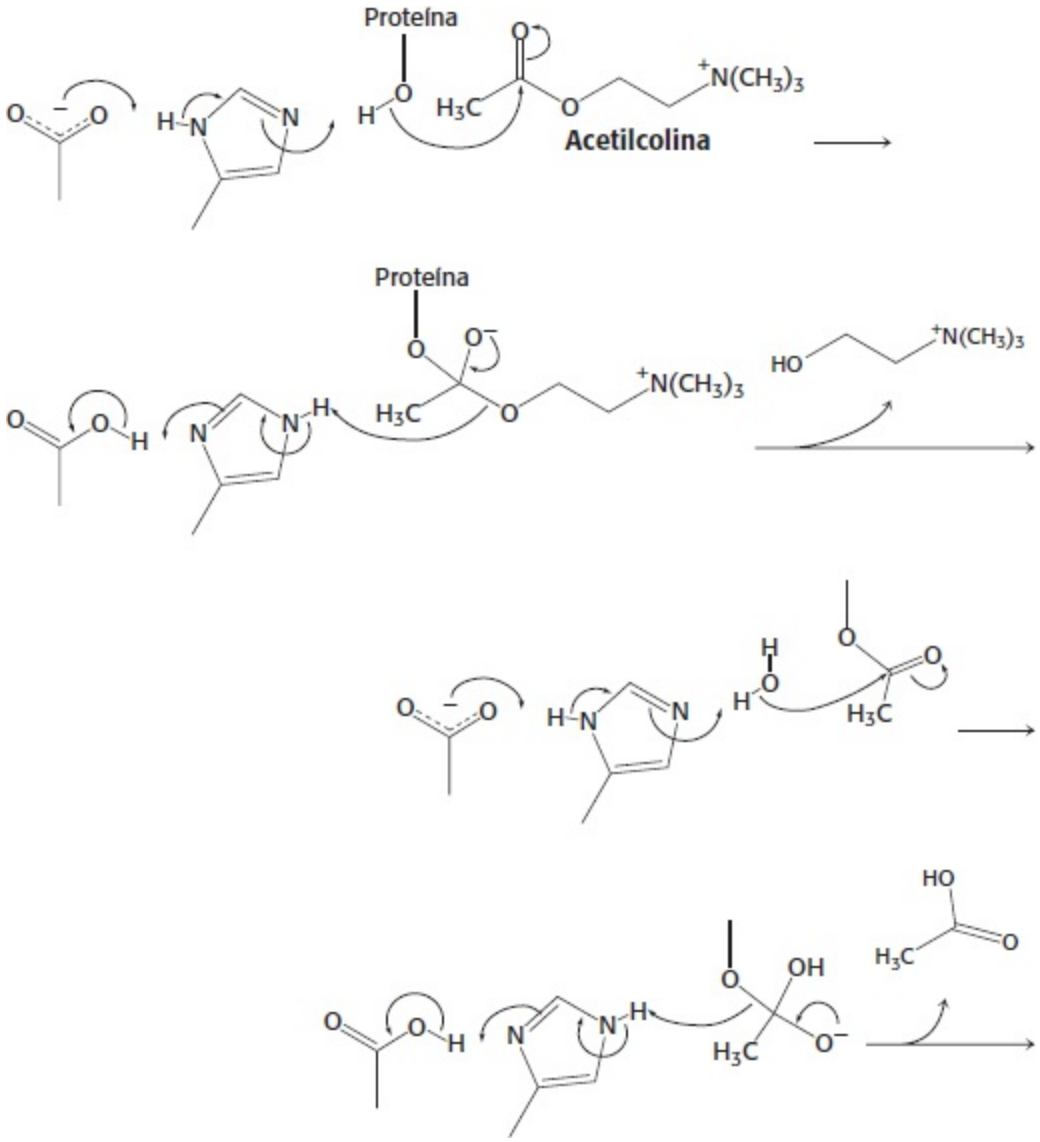
24. A batraquiotoxina bloqueia a transição do estado aberto para o fechado.

25. (a) Os íons cloreto fluem para dentro da célula. (b) O fluxo de cloreto é inibitório, visto que ele hiperpolariza a membrana. (c) O canal é constituído de cinco subunidades.

26. Após a adição de ATP e cálcio, a SERCA irá bombear íons Ca^{2+} para dentro da vesícula. Entretanto, o acúmulo de íons Ca^{2+} dentro da vesícula levará rapidamente à formação de um gradiente elétrico, que não pode ser superado pela hidrólise do ATP. A adição de calcimicina possibilitará o fluxo retrógrado dos íons Ca^{2+} bombeados para fora da vesícula, dissipando o acúmulo de carga e permitindo a operação contínua da bomba.

27. O poder catalítico da acetilcolinesterase assegura que a duração do estímulo nervoso seja curta.

28. Veja a reação a seguir.



29. (a) Apenas o ASIC1a é inibido pela toxina. (b) Sim. Quando a toxina foi removida, a atividade do canal sensível a ácido começou a ser restaurada. (c) 0,9 nM.

30. Essa mutação pertence a uma classe de mutações que resultam na síndrome do canal lento (SCS). Os resultados sugerem um defeito no fechamento do canal. Por conseguinte, o canal permanece aberto por períodos prolongados. De modo alternativo, o canal pode exibir maior afinidade pela acetilcolina do que o canal de controle.

31. A mutação reduz a atividade da acetilcolina pelo receptor. Os registros devem mostrar o canal aberto apenas raramente.

32. A glicose exibe uma curva de transporte que sugere a participação de um carreador, visto que a velocidade inicial é alta, e a seguir se nivela em concentrações mais altas, o que é compatível com a saturação do carreador, que lembra as enzimas de Michaelis-Menten (Seção 8:4). O indol não exibe esse fenômeno de saturação, o que implica que a molécula é lipofílica e simplesmente se difunde através da membrana. A ouabaína é um inibidor específico da bomba de Na^+–K^+. Se a ouabaína inibisse o transporte de glicose, um cotransportador de Na^+-glicose estaria auxiliando no transporte.

Capítulo 14

1. Os resíduos de glutamato de carga negativa imitam os resíduos de fosfosserina ou fosfotreonina de carga negativa e estabilizam a conformação ativa da enzima.

2. Não. A fosfosserina e a fosfotreonina são consideravelmente mais curtas do que a fosfotirosina.

3. A atividade de GTPase termina o sinal. Sem essa atividade, após determinada via ter sido ativada, ela continua ativada e não responde a variações do sinal inicial. Se a atividade de GTPase fosse mais eficiente, o tempo de sobrevida da subunidade G_α ligada ao GTP seria muito curto para efetuar a sinalização distal.

4. Duas moléculas idênticas de receptor devem reconhecer diferentes aspectos da mesma molécula sinalizadora.

5. Os receptores de fatores de crescimento podem ser ativados por dimerização. Se um anticorpo provocar a dimerização de um receptor, a via de transdução de sinais em uma célula será ativada.

6. A subunidade α mutante estará sempre na forma com GTP e, portanto, na forma ativa, estimulando a sua via de sinalização.

7. Uma proteína G é um componente da via de transdução de sinais. O GTPγS não é hidrolisado pela subunidade G_{α}, resultando em ativação prolongada.

8. Os íons cálcio difundem lentamente, visto que se ligam a muitas superfícies de proteínas dentro de uma célula, impedindo o seu movimento livre. O AMP cíclico não se liga tão frequentemente, razão pela qual ele se difunde mais rapidamente.

9. O Fura-2 é uma molécula com alta carga negativa, que apresenta cinco grupos de carboxilato. Sua carga impede que atravesse efetivamente a região hidrofóbica da membrana plasmática.

10. A $G_{\alpha s}$ estimula a adenilato ciclase, levando à geração de cAMP. Em seguida, esse sinal leva à mobilização da glicose (ver Capítulo 21). Se a cAMP fosfodiesterase fosse inibida, os níveis de cAMP permaneceriam altos, mesmo após o término do sinal da epinefrina, e a mobilização de glicose continuaria.

11. Se dois domínios de quinase forem forçados a estar em íntima proximidade um com o outro, a alça de ativação de uma quinase, em sua conformação inativa, pode ser deslocada pela alça de ativação da outra quinase, que atua como substrato para a fosforilação.

12. A rede completa das vias iniciadas pela insulina inclui um grande número de proteínas e é substancialmente mais elaborada do que aquela indicada na Figura 14.25. Além disso, muitas outras proteínas participam na terminação da sinalização da insulina. A ocorrência de um defeito em qualquer uma das proteínas nas vias de sinalização da insulina ou na terminação subsequente da resposta à insulina poderia potencialmente causar problemas. Por conseguinte, não é surpreendente que muitos defeitos gênicos diferentes possam causar diabetes tipo 2.

13. A ligação do hormônio do crescimento causa dimerização de seu receptor monomérico. Em seguida, o receptor dimérico pode ativar uma tirosina quinase separada à qual o receptor se liga. A via de sinalização pode então continuar de modo semelhante às vias que são ativadas pelo receptor de insulina ou por outros receptores de EGF de mamíferos.

14. O receptor truncado sofrerá dimerização com monômeros de comprimento integral após a ligação do EGF; todavia, não pode ocorrer fosforilação cruzada, visto que o receptor truncado não apresenta o substrato para o domínio de quinase adjacente, nem o seu próprio domínio de quinase para fosforilar a cauda C-terminal do outro monômero. Por conseguinte, esses receptores mutantes bloquearão a sinalização normal do EGF.

15. A insulina inicia a resposta que é normalmente causada pelo EGF. A ligação da insulina provavelmente estimularia a dimerização e a fosforilação do receptor quimérico e, portanto, sinalizaria os eventos distais que normalmente são desencadeados pela ligação do EGF. A exposição dessas células a EGF não teria nenhum efeito.

16. 10^5

17. A formação de diacilglicerol implica a participação da fosfolipase C. Uma via simples levaria à ativação do receptor por fosforilação cruzada, seguida da ligação da fosfolipase Cγ (por meio de seus domínios SH2). A participação de fosfolipase C indica que deve haver formação de IP_3 e, portanto, aumento das concentrações de cálcio.

18. Outros alvos potenciais de fármacos na cascata de sinalização do EGF incluem os sítios ativos de quinase do receptor de EGF, MEK ou ERK, porém não se limitam a eles.

19. Na reação catalisada pela adenilato ciclase, o grupo 3'-OH efetua um ataque nucleofílico ao átomo de fósforo α ligado ao grupo 5'-OH, levando ao deslocamento do pirofosfato. A reação catalisada pela DNA polimerase é semelhante, exceto que o grupo 3'-OH está em um nucleotídio diferente.

20. Os inibidores competitivos do ATP tendem a atuar em múltiplas quinases, visto que cada domínio de quinase contém um sítio de ligação do ATP. Por conseguinte, esses fármacos podem não ser seletivos para a quinase-alvo desejada.

21. (a) $X \approx 10^{-7}$ M; $Y \approx 5 \times 10^{-6}$ M; $Z \approx 10^{-3}$ M. (b) Como existe a necessidade de muito menos X para ocupar metade dos sítios, X apresenta a maior afinidade. (c) A afinidade de ligação corresponde quase perfeitamente à capacidade de estimular a adenilato ciclase, sugerindo que o complexo hormônio-receptor leva ao estímulo da adenilato ciclase. (d) procure efetuar o experimento na presença de anticorpos $G_{\alpha s}$.

22. (a) A ligação total não diferencia a ligação a um receptor específico da ligação a diferentes receptores ou da ligação inespecífica à membrana.

(b) O raciocínio lógico é que o receptor terá uma alta afinidade pelo ligante. Por conseguinte, na presença de excesso de ligante não radioativo, o receptor irá se ligar ao ligante não radioativo. Por conseguinte, qualquer ligação do ligante radioativo deve ser inespecífica.

(c) O platô alcançado sugere que o número de sítios de ligação do receptor na membrana celular é limitado.

23. Número de receptores por célula =

$$\frac{10^4 \text{ cpm}}{\text{mg de proteína de membrana}} \times \frac{\text{mg de proteína de membrana}}{10^{10} \text{ células}} \times \frac{\text{mmol}}{10^{12} \text{ com}} \times \frac{6{,}023 \times 10^{20} \text{ moléculas}}{\text{mmol}} = 600$$

Capítulo 15

1. As reações bioquímicas extremamente integradas que ocorrem no compartimento intracelular.

2. Anabolismo é o conjunto de reações bioquímicas que utilizam energia para construir novas moléculas e, finalmente, novas células. Catabolismo é o conjunto de reações bioquímicas que extrai energia de fontes energéticas ou da quebra de macromoléculas.

3. Os movimentos celulares e o desempenho do trabalho mecânico; transporte ativo; reações biossintéticas.

4. 1. f; 2. h; 3. i; 4. a; 5. g; 6. b; 7. c; 8. e; 9. j; 10. d.

5. Repulsão de carga; estabilização por ressonância e estabilização por hidratação.

6. Questão difícil. Não se sabe a resposta. A adenosina parece se formar mais prontamente em condições prebióticas; assim, o ATP pode ter inicialmente predominado.

7. Ter apenas um nucleotídio significa que a energia disponível permite à célula monitorar melhor seu *status* energético.

8. Aumentar as concentrações de ATP ou diminuir a concentração celular de ADP e P_i (p. ex., por remoção pelas outras reações) tornaria a reação mais exergônica. Igualmente, alterar a concentração de Mg^{2+} poderia aumentar ou diminuir ΔG da reação.

9. As variações de energia livre das etapas individuais de uma via metabólica são somadas para determinar a variação global de energia livre da via inteira. Em consequência, a reação com um valor de energia livre padrão positivo pode ser impulsionada se acoplada a uma reação suficientemente exergônica.

10. (a) e (c) para a esquerda, reações (b) e (d) para a direita.

11. Nenhuma

12. (a) $\Delta G^{o'} = 31{,}4$ kJ mol^{-1} (7,5 kcal mol^{-1}) e $K'_{eq} = 3{,}06 \times 10^{-6}$; (b) $3{,}28 \times 10^4$.

13. $\Delta G^{o'} = 7{,}1$ kJ mol^{-1} (1,7 kcal mol^{-1}). A relação de equilíbrio é de 17,8.

14. (a) Acetato + CoA + H^+ origina acetil-CoA + H_2O, $\Delta G^{o'} = -31{,}4$ kJ mol^{-1} (–7,5 kcal mol^{-1}). Hidrólise do ATP para AMP e PP_i, $\Delta G^{o'} = -45{,}6$ kJ mol^{-1} (–10,9 kcal mol^{-1}). Reação global, $\Delta G^{o'} = -14{,}2$ kJ mol^{-1} (–3,4 kcal mol^{-1}).

(b) Com a hidrólise do pirofosfato, $\Delta G^{o'} = -33{,}4$ kJ mol^{-1} (–7,98 kcal mol^{-1}). A hidrólise do pirofosfato torna a reação global mais exergônica.

15. (a) Para um ácido, AH,

$$AH \rightleftharpoons A^{-1} + H^+ \; K = \frac{[A^-]\,[H^+]}{[AH]}$$

O pK é definido como p$K = -\log_{10} K$. $\Delta G^{o'}$ é a energia livre padrão em pH 7. Assim, $\Delta G^{o'} = -RT \ln K = -2{,}303\, RT \log_{10} K = +2{,}303\, RT$ pK.

(b). $\Delta G^{o'} = 27{,}32$ kJ mol^{-1} (6,53 kcal mol^{-1}).

16. A arginina fosfato no músculo de invertebrados, do mesmo modo que a fosfocreatina no músculo de vertebrados, funciona como um reservatório de grupo fosforila de alto potencial. A arginina fosfato mantém um alto nível de ATP durante o esforço muscular.

17. Uma unidade de ADP

18. (a) A base lógica por detrás da suplementação de creatina é que ela seria convertida em fosfocreatina, e, assim funciona como um meio rápido de repor ATP após a contração muscular. (b) Se a suplementação de creatina fosse benéfica, afetaria as atividades que dependem de rápidas explosões de atividade muscular; qualquer atividade sustentada necessitaria da síntese de ATP pelo metabolismo energético, que como mostrado na Figura 15.7, necessita de mais tempo.

19. Em condições padrão, $\Delta G^{o'} = -RT \ln$ [produtos]/[reagentes]. Substituindo $\Delta G^{o'}$ por 23,8 kJ mol^{-1} (5,7 kcal mol^{-1}) e resolvendo a equação por [produtos]/[reagentes], obtêm-se 7×10^{-5}. Em outras palavras, a reação para frente não corre em uma extensão

significativa. Em condições intracelulares, ΔG é –1,3 kJ mol^{-1} (–0,3 kcal mol^{-1}). Utilizando a equação $\Delta G = \Delta G^{o'} + RT \ln$ [produtos]/[reagentes] e resolvendo-a por [produtos]/[reagentes], a relação é de $3,7 \times 10^{-5}$. Portanto, uma reação que é endergônica em condições padrões pode ser transformada em uma exergônica pela manutenção da relação [produtos]/[reagentes] abaixo do valor de equilíbrio. Essa conversão é geralmente alcançada pela utilização de produtos em uma outra reação acoplada logo que eles sejam formados.

20. Em condições padrões

$$K'_{eq} = \frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} \times \frac{[ADP]_{eq}[P_i]_{eq}}{[ATP]_{eq}} = 10^{3,3/1,36} = 2,67 \times 10^2$$

No equilíbrio, a relação entre [B] e [A] é dada por $[B]_e\,[ATP]_{eq}$

$$\frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} = K'_{eq}\frac{[ATP]_{eq}}{[ADP]_{eq}[P_i]_{eq}}$$

O sistema de células gerador de ATP mantém a proporção [ATP]/ $[ADP][P_i]$ em um nível alto. Tipicamente cerca de 500 M^{-1}. Para esta relação,

$$\frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} = 2,67 \times 10^2 \times 500 = 1,34 \times 10^5$$

Este equilíbrio é impressionantemente diferente do valor de $1,15 \times 10^{-3}$ para a reação A → B na ausência da hidrólise de ATP. Em outras palavras, o acoplamento da hidrólise de ATP com a conversão de A em B alterou a relação de equilíbrio entre B e A por um fator de 10^8.

21. Fígado= –45,2 kJ mol^{-1} (–10,8 kcal mol^{-1}); músculo = –48,1 kJ mol^{-1} (–11,5 kcal mol^{-1}); cérebro = –48,5 kJ mol^{-1} (–11,6 kcal mol^{-1}). A ΔG é a mais negativa nas celulas nervosas.

22. (a) Etanol; (b), lactato; (c) succinato; (d) isocitrato; (e) malato; (f) 2-fosfoglicerato.

23. Lembre que $\Delta G = \Delta G^{o'} + RT \ln$ [produtos]/[reagentes]. A alteração da proporção entre produtos e regentes causará a variação da ΔG. Na glicólise, as concentrações dos componentes da via resultam em um valor de ΔG muito maior do que o de $\Delta G^{o'}$.

24. A não ser que o alimento ingerido seja convertido em moléculas capazes de serem absorvidas pelo intestino, nenhuma energia pode ser extraída pelo organismo.

25. NADH e $FADH_2$ são carreadores de elétrons do catabolismo; NADPH é o carreador do anabolismo.

26. Os elétrons da ligação C-O não podem formar estruturas de ressonância com a ligação C-S com a mesma estabilidade. Portanto, o tioéster não é estabilizado por ressonância no mesmo grau que um éster de oxigênio.

27. Reações de oxirredução; reações de ligação; reações de isomerização; reações de transferência de grupos; reações hidrolíticas; a adição de grupos funcionais às duplas ligações para formar ligações simples ou a remoção de grupos funcionais para formar duplas ligações.

28. Controlando a quantidade de enzimas; controlando a atividade enzimática; controlando a disponibilidade de substratos.

29. Embora a reação seja termodinamicamente favorável, os reagentes são cineticamente estáveis, por causa da grande energia de ativação. As enzimas diminuem a energia de ativação, de modo que as reações ocorrem na escala de tempo necessitada pela célula.

30. A forma ativada de sulfato na maioria dos organismos é 3'-fosfoadenosina 5'-fosfossulfato.

31. (a) Quando cai a concentração de Mg^{2+}, sobe ΔG da hidrólise. Observe que pMg é um traçado logarítmico, e, assim, cada número do eixo de *x* representa uma variação de 10 vezes na $[Mg^{2+}]$.

(b)Mg^{2+} se ligaria aos fosfatos do ATP e ajudaria a mitigar a repulsão de carga. À medida que caísse $[Mg^{2+}]$, a estabilização da carga do ATP seria menor, levando a uma maior repulsão de cargas e a um aumento de ΔG na hidrólise.

Capítulo 16

1. São produzidas duas moléculas de ATP por molécula de gliceraldeído 3-fosfato e, como duas moléculas de ATP são produzidas por molécula de glicose, o total produzido de ATP é quatro. Contudo, são necessárias duas moléculas de ATP para converter glicose em frutose 1,6-bisfosfato. Portanto, o equilíbrio resultante é de apenas duas moléculas de ATP.

2. Em ambos os casos, o doador de elétrons é o gliceraldeído 3-fosfato. Na fermentação láctica, o aceptor de elétrons é o piruvato,

convertendo-o em lactato. Na fermentação alcoólica, o acetaldeído é o aceptor de elétrons, formando etanol.

3. (a) 3 ATP; (b) 2 ATP; (c) 2 ATP; (d) 2 ATP; (e) 4 ATP.

4. A glicoquinase capacita o fígado a remover glicose do sangue quando a hexoquinase está saturada, assegurando que a glicose seja capturada para emprego posterior.

5. A glicólise é um componente da fermentação alcoólica, a via que produz álcool para cerveja e vinho. A convicção era que o entendimento da base bioquímica da produção de álcool levaria a um meio mais eficiente de produzir cerveja.

6. A conversão de gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato seria bloqueada. A glicólise seria menos eficiente.

7. Glicose 6-fosfato tem de ter outros destinos. De fato, ela pode ser convertida em glicogênio (Capítulo 21) ou ser processada para formar poder redutor para biossínteses (Capítulo 20).

8. As necessidades energéticas de uma célula muscular variam amplamente, do repouso ao exercício intenso. Em consequência, é vital a regulação da fosfofrutoquinase pela carga energética. Em outros tecidos, como o fígado, a concentração de ATP é menos provável flutuar e não seria um regulador importante da fosfofrutoquinase.

9. A $\Delta G^{o'}$ para o reverso da glicólise é +96 kJ mol^{-1} (+23 kcal mol^{-1}), endergônica demais para ocorrer.

10. A conversão de glicose em glicose 6-fosfato pela hexoquinase; a conversão de frutose 6-fosfato em frutose 1,6-bisfosfato pela fosfofrutoquinase; a formação de piruvato a partir de fosfoenolpiruvato pela piruvatoquinase.

11. Ácido láctico é um ácido forte. Se ele permanecesse na célula, o pH celular cairia, o que levaria à desnaturação da proteína muscular e resultaria em lesão do tecido.

12. GLUT2 transporta glicose apenas quando sua concentração sanguínea é alta, que é precisamente a condição na qual as células β pancreáticas secretam insulina.

13. Frutose + ATP → frutose 1-fosfato + ADP:

Frutoquinase

Frutose 1-fosfato → di-hidroxiacetona fosfato + gliceraldeído:
Frutose 1-fosfato aldolase

Gliceraldeído + ATP → gliceraldeído 3-fosfato + ADP:
Triose quinase

A etapa principal de regulação da glicólise catalisada pela fosfofrutoquinase é contornada pelas reações anteriores. A glicólise ocorrerá de um modo desregulado.

14. Sem triose isomerase, apenas uma das duas moléculas de três carbonos produzidas pela aldolase poderia ser utilizada para produzir ATP. Apenas resultariam duas moléculas de ATP do metabolismo de cada glicose. Mas, duas moléculas de ATP seriam ainda necessárias para formar frutose 1,6-bisfosfato, o substrato da aldolase. O equilíbrio resultante da produção de ATP seria zero, uma produção incompatível com a vida.

15. Glicose é reativa porque sua forma aberta contém um grupo aldeído.

16. (a) A marcação está no carbono da metila do piruvato. (b) 5 mCi mM^{-1}. A atividade específica é dividida em partes iguais, porque o número de moles do produto (piruvato) é duas vezes a do substrato marcado (glicose).

17. (a) Glicose + 2 P_i + 2 ADP → 2 lactato + 2 ATP (b) $\Delta G = -114$ kJ mol^{-1} (–27,2 kcal mol^{-1})

18. $3{,}06 \times 10^{-5}$

19. As concentrações no equilíbrio de frutose 1,6-bisfosfato, di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato são $7{,}8 \times 10^{-4}$ M, $2{,}2 \times 10^{-4}$ M e $2{,}2 \times 10^{-4}$ M, respectivamente.

20. Todos os três carbonos do 2,3-BPG estão marcados com ^{14}C. O átomo de fósforo ligado à hidroxila em C-2 está marcado com ^{32}P.

21. A hexoquinase tem um baixa atividade de ATPase na ausência de uma ose, porque ela está em uma conformação cataliticamente inativa. A adição de xilose fecha a fenda entre os dois lobos da enzima. Contudo, a xilose não possui grupamento hidroximetila, e assim não pode ser fosforilada. Em vez disso, uma molécula de água no local normalmente ocupado pelo C-6 hidroximetila atua como um aceptor de fosforila do ATP.

22. (a) A via da frutose 1-fosfato forma gliceraldeído 3-fosfato.

(b) Fosfofrutoquinase, uma enzima regulatória importante, é contornada.

Ainda mais, a frutose 1-fosfato estimula a piruvatoquinase.

23. O reverso da glicólise é muito endergônico em condições celulares. O gasto de seis moléculas de NTP na gliconeogênese torna a gliconeogênese endergônica.

24. O ácido láctico é capaz de ser oxidado, sendo assim energia útil. A conversão deste ácido em glicose poupa os átomos de carbono para futura combustão.

25. Na glicólise, a formação de piruvato e ATP pela piruvatoquinase é irreversível. Esta etapa é contornada por duas reações da gliconeogênese: (1) a formação de oxaloacetato a partir de piruvato e CO_2 pela piruvato carboxilase e (2) a formação de fosfoenolpiruvato a partir de oxaloacetato e GTP pela fosfoenolpiruvato carboxiquinase. A formação de frutose 1,6-bisfosfato pela fosfofrutoquinase é contornada pela frutose 1,6-bisfosfatase da gliconeogênese, que catalisa a conversão de frutose 1,6-bisfosfato a frutose 6-fosfato. Por fim, a formação de glicose 6-fosfato catalisada pela hexoquinase na glicólise é contornada pela glicose 6-fosfatase, mas apenas no fígado.

26. Regulação inversa nas enzimas alostéricas principais nas duas vias. Por exemplo, PFK é estimulada por frutose 2,6-bisfosfato e AMP. O efeito destes sinais é oposto ao da frutose 1,6-bisfosfatase. Se ambas as vias operassem simultaneamente, o resultado seria um ciclo fútil. ATP seria hidrolisado, produzindo apenas calor.

27. É provável que o músculo produza ácido láctico durante a contração. Este é um ácido forte e não pode se acumular no músculo ou sangue. O fígado remove-o do sangue convertendo-o em glicose. Esta pode ser liberada no sangue ou armazenada como glicogênio para utilização posterior.

28. A glicose produzida pelo fígado não poderia ser liberada no sangue. Os tecidos que dependem de glicose como fonte energética, não poderiam funcionar tão bem, a não ser que a glicose fosse fornecida na alimentação.

29. Glicose é uma fonte energética importante para ambos os tecidos e é essencialmente a única fonte energética para o cérebro. Em consequência, esses tecidos nunca deveriam liberar glicose. A liberação de glicose é impedida pela ausência de glicose 6-fosfatase.

30. 6 NTP (4 ATP e 2 GTP); 2 NADH.

31. (a) Nenhuma; (b) nenhuma; (c) 4 (2 ATP e 2 GTP); (d) nenhuma.

32. Se os grupamentos amino fossem removidos da alanina e do aspartato, os cetoácidos, piruvato e oxaloacetato, seriam formados. Essas duas moléculas são componentes da gliconeogênese.

33. (a) Aumentada; (b) aumentada (c) aumentada; (d) diminuída.

34. Frutose 2,6-bisfosfato, presente em alta concentração quando a glicose é farta, normalmente inibe a gliconeogênese por bloquear a frutose 1,6-bisfosfatase. Neste distúrbio genético, a fosfatase é ativa independente do nível de glicose. Daí, o ciclo de substratos está aumentado. O nível de frutose 1,6-bisfosfato é consequentemente menor do que o normal. É formado menos piruvato e, portanto menos ATP é produzido.

35. As reações nas partes *b* e *e* seriam bloqueadas.

36. Não haveria carbonos marcados. O CO_2 adicionado ao piruvato (formado a partir do lactato) para formar oxaloacetato é perdido com a conversão de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato.

37. A reação resultante na presença de arseniato é

Gliceraldeído 3-fosfato + NAD^+ + H_2O →

3-fosfoglicerato + NADH + $2H^+$

A glicólise ocorre na presença de arseniato, mas o ATP normalmente formado na conversão de 1,3-bisfosfoglicerato em 3-fosfoglicerato é perdido. Portanto, o arseniato desacopla a oxidação e a fosforilação ao formar um acilarseniato muito lábil.

38. Este exemplo ilustra diferença entre a utilização *estequiométrica* e a *catalítica* de uma molécula. Se as células utilizassem NAD^+ de modo estequiométrico, seria necessária uma nova molécula de NAD^+ cada vez que uma molécula de lactato fosse produzida. Como veremos, a síntese de NAD^+ precisa de ATP. Por outro lado, se o NAD^+ que é convertido em NADH pudesse ser reciclado e reutilizado, uma pequena quantidade da molécula poderia regenerar uma enorme quantidade de lactato, que é o caso na célula. NAD^+ é regenerado pela oxidação de NADH e reutilizado. Portanto, NAD^+ é empregado de modo catalítico.

39. Considere a reação de equilíbrio da adenilato quinase:

$$K_{eq} = [ATP]\,[AMP]/[ADP]^2 \quad (1)$$

ou

$$[AMP] = K_{eq}\,[ADP_2]/[ATP] \quad (2)$$

Lembre-se de que [ATP] > [ADP] > [AMP] na célula. À medida que o ATP é utilizado, resultará uma pequena diminuição na sua concentração com um aumento muito maior na porcentagem de [ADP] porque a sua concentração é maior do que a do ATP. Este aumento muito maior de porcentagem na [ADP] resultará em um aumento ainda muito maior da porcentagem na [AMP], porque a concentração de AMP relaciona-se ao quadrado da [ADP]. Em essência, a equação 2 mostra que o monitoramento do *status* energético com AMP amplifica pequenas variações na [ATP], levando a um controle mais rígido.

40. A síntese de glicose durante o exercício intenso fornece um bom exemplo de cooperação entre órgãos em organismos superiores. Quando o músculo está ativamente se contraindo, lactato é produzido da glicólise. O lactato é liberado para o sangue e absorvido pelo fígado, onde ele é convertido pela gliconeogênese em glicose. A glicose recém-sintetizada é então liberada e capturada pelo músculo para a geração de energia.

41. A entrada de quatro moléculas adicionais de alto potencial de transferência de fosforila na gliconeogênese desloca a constante de equilíbrio por um fator de 10^{32}, o que torna a conversão de piruvato em glicose termodinamicamente factível. Sem esta entrada energética, não ocorreria a gliconeogênese.

42. O mecanismo é análogo ao da triose fosfato isomerase (Figura 16.5). Ele ocorre por um intermediário enendiol. Seria esperado que o sítio ativo contivesse uma base geral (análogo ao do Glu 165 na TPI) ou um ácido geral (análogo ao da His 95 na TPI).

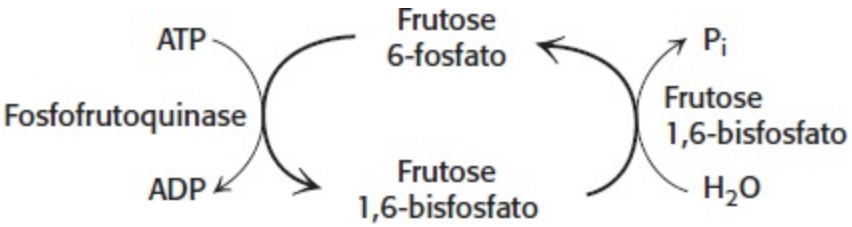
43. Galactose é um componente de glicoproteínas. Possivelmente, a ausência desta ose leva à formação ou função impróprias de glicoproteínas necessárias ao sistema nervoso central. Mais genericamente, o fato de que os sintomas surgem na ausência de galactose sugere que a galactose é necessária de algum modo.

44. Frutose 2,6-bisfosfato estabiliza o estado R da enzima.

45. (a) Curiosamente, a enzima utiliza ADP, e não ATP, como doador de fosforila.

(b) Ambos, AMP e ATP, comportam-se como inibidores competitivos de ADP, o doador de fosforila. Aparentemente, a enzima do *P. furiosus* não é inibida alostericamente pelo ATP.

46. (a) Se ambas as enzimas operassem simultaneamente, ocorreriam as seguintes reações:



A resultante seria simplesmente:

$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i$$

Esta energia da hidrólise do ATP seria liberada como calor.

(b) Não. Para o ciclo gerar calor, ambas as enzimas têm de ser funcionais ao mesmo tempo na mesma célula.

(c) As espécies *B. terrestris* e *B. rufocinctus* poderiam mostrar algum ciclo fútil, porque ambas as enzimas são ativas em um grau significativo.

(d) Não. Estes resultados sugerem simplesmente que é improvável que a atividade simultânea da fosfofrutoquinase e da frutose 1,6-bisfosfatase seja empregada para gerar calor nas espécies mostradas.

Capítulo 17

1. A piruvato desidrogenase catalisa a descarboxilação do piruvato e a formação de acetil-lipoamida. A di-hidrolipoil transacetilase catalisa a formação de acetil-CoA. A di-hidrolipoil desidrogenase catalisa a redução do ácido lipoico oxidado. A quinase associada ao complexo fosforila e inativa o complexo, enquanto a fosfatase desfosforila e ativa o complexo.

2. A tiamina pirofosfato participa da descarboxilação do piruvato. O ácido lipoico (na forma de lipoamida) transfere o grupamento acetila. A coenzima A aceita o grupamento acetila do ácido lipoico para formar acetil-CoA. FAD aceita os elétrons e os íons hidrogênio quando o ácido lipoico reduzido é oxidado. NAD^+ aceita elétrons de $FADH_2$.

3. Enzimas catalíticas (TPP, ácido lipoico e FAD) são modificadas, mas regeneradas, a cada ciclo de reação. Assim, elas conseguem participar do processamento de muitas moléculas de piruvato. Coenzimas esteoiquiométricas (coenzima A e NAD^+) são usadas em apenas uma reação porque são componentes de produtos da reação.

4. As vantagens são as seguintes:

A reação é facilitada pelo fato de os sítios ativos estarem próximos.
Os reagentes não deixam a enzima até a formação do produto final.
A limitação dos reagentes minimiza a perda por difusão e as reações colaterais.
Todas as enzimas estão presentes nas quantidades adequadas. A regulação é mais eficiente porque as enzimas reguladoras – a quinase e a fosfatase – fazem parte do complexo.

5. (a) Após uma volta do ciclo do ácido cítrico, o marcador aparece em C-2 e C-3 do oxaloacetato. (b) O marcador aparece no CO_2 na formação de acetil-CoA a partir do piruvato. (c) Após uma volta do ciclo do ácido cítrico o marcador aparece em C-1 e C-4 do oxaloacetato. (d) e (e) Mesmo destino da parte *a*.

6. (a) Isocitrato liase e malato sintase são necessárias além das enzimas do ciclo do ácido cítrico.

(b) 2 acetil-CoA + 2 NAD^+ + FAD + $3H_2O$ → oxaloacetato + 2 CoA + 2 NADH + 2 $FADH_2$ + 3 H^+

(c) Não. Por isso, os mamíferos não conseguem realizar a síntese efetiva de oxaloacetato a partir de acetil-CoA.

7. –41,0 kJ mol^{-1} (–9,8 kcal mol^{-1})

8. As enzimas ou os complexos enzimáticos são catalisadores biológicos. É preciso lembrar que um catalisador facilita uma reação química sem que o catalisador seja modificado de modo permanente. O oxaloacetato pode ser considerado um catalisador porque se liga a um grupamento acetila, promove a descarboxilação oxidativa dos dois átomos de carbono e é regenerado ao final do ciclo. O oxaloacetato (e qualquer intermediário do ciclo) atua como um catalisador.

9. Tiamina tiazolona pirofosfato é um análogo de estado de transição. O anel que contém enxofre desse análogo não tem carga elétrica e assemelha-se muito ao estado de transição da coenzima normal nas reações catalisadas por tiamina (p. ex., a forma de ressonância sem carga elétrica de hidroxietil-TPP).

10. A redução do O_2 exige aumento da glicólise anaeróbica para produção de energia, resultando na geração de muito ácido láctico. Em condições de choque, um inibidor de quinase é administrado para garantir a atuação máxima da piruvato desidrogenase.

11. Acetil-lipoamida e acetil-CoA.

12. Nos músculos, a acetil-CoA gerada pelo complexo é utilizada para geração de energia. Consequentemente, os sinais que indicam um estado rico em energia (razões elevadas de ATP/ADP e NADH/NAD^+) inibem o complexo, enquanto as condições inversas estimulam a enzima. O cálcio como sinal para contração muscular (e, portanto, necessidade de energia) também estimula a enzima. No fígado, a acetil-CoA derivada do piruvato é usada para fins de biossíntese, tais como a síntese de ácidos graxos. A insulina, o hormônio que denota o estado alimentado, estimula o complexo.

13. (a) O aumento da atividade da quinase resulta em redução da atividade do complexo PDH porque a fosforilação pela quinase inibe o complexo.

(b) A fosfatase ativa o complexo ao retirar um fosfato. Se a atividade da fosfatase for reduzida, a atividade do complexo PDH também diminuirá.

14. Ela poderia ter ingerido, de alguma maneira, o arsenito existente na tinta que estava descascando ou do papel de parede. Ela também poderia ter inalado gás arsina do papel de parede, que teria sido oxidado a arsenito em seu corpo. Em qualquer dessas circunstâncias, o arsenito inibe enzimas que precisam de ácido lipoico – principalmente o complexo PDH.

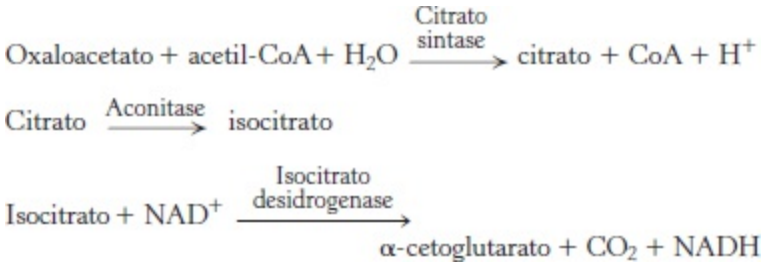
15. O ciclo do ácido cítrico depende de um aporte constante de NAD^+, que é tipicamente gerado a partir de NADH (reação de NADH com oxigênio). Se não houver oxigênio para aceitar os elétrons, o ciclo do ácido cítrico deixará de "funcionar".

16. (a) As concentrações em equilíbrio dinâmico dos produtos são baixas em comparação com as concentrações dos substratos. (b) A razão entre malato e oxaloacetato tem de ser superior a $1{,}57 \times 10^4$ para ser formado oxaloacetato.

17.

$$\text{Piruvato} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \xrightarrow[\text{desidrogenase}]{\text{Complexo piruvato}} \text{acetil-CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$$

$$\text{Piruvato} + \text{CO}_2 + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{carboxilase}]{\text{Piruvato}} \text{oxaloacetato} + \text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^+$$



Final: 2 Piruvato + 2 NAD^+ + ATP + H_2O →

α-cetoglutarato + CO_2 + ADP + P_i + 2 NADH + 3 H^+

18. A concentração de succinato aumentará, seguida pelas concentrações de α-cetoglutarato e outros intermediários "a montante" no lado da inibição. O succinato tem dois grupamentos metileno que são necessários para a desidrogenação, enquanto o malonato tem apenas um.

19. A piruvato carboxilase está ativa apenas quando a concentração de acetil-CoA está elevada. A acetil-CoA poderia se acumular se as demandas energéticas da célula não fossem atendidas em decorrência de deficiência de oxaloacetato. Nessas condições, a piruvato carboxilase catalisa uma reação anaplerótica. Por outro lado, a acetil-CoA poderia se acumular porque as demandas energéticas da célula foram atendidas. Nessa circunstância, o piruvato será convertido novamente em glicose e a primeira etapa nessa conversão é a formação de oxaloacetato.

20. A energia liberada quando o succinato é reduzido a fumarato não é suficiente para impulsionar a síntese de NADH, mas é suficiente para reduzir FAD.

21. Citrato é um álcool terciário que não pode ser oxidado porque a oxidação exige a retirada de um átomo de hidrogênio do álcool e a retirada de um átomo de hidrogênio do átomo de carbono ligado ao álcool. Não existe esse hidrogênio no citrato. A isomerização converte o álcool terciário em isocitrato, que é um álcool secundário que pode ser oxidado.

22. Porque a enzima nucleosídio difosfoquinase transfere um grupamento fosforila de GTP (ou de qualquer nucleosídio trifosfato) para ADP de acordo com a reação reversível:

$$GTP + ADP \rightleftarrows GDP + ATP$$

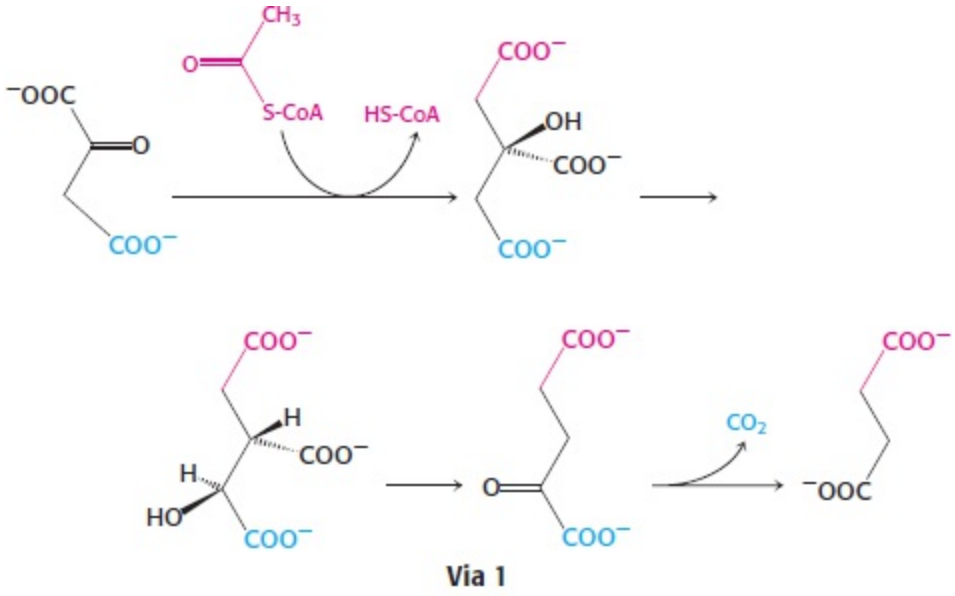
23. A reação é impulsionada pela hidrólise de um tioéster. A acetil-CoA fornece o tioéster que é convertido em citril-CoA. Quando esse tioéster é hidrolisado, forma-se citrato em uma reação irreversível.

24. Os seres humanos não conseguem fazer a conversão efetiva de gorduras em glicose porque o único meio de obter os átomos de carbono das gorduras para o oxaloacetato, o precursor da glicose, é através do ciclo do ácido cítrico. Embora dois átomos de carbono entrem no ciclo como acetil-CoA, dois átomos de carbono são perdidos na forma de CO_2 antes da formação do oxaloacetato. Assim sendo, embora alguns átomos de carbono das gorduras acabem se tornando átomos de carbono na glicose, os seres humanos não conseguem obter uma síntese *efetiva* de glicose a partir de gorduras.

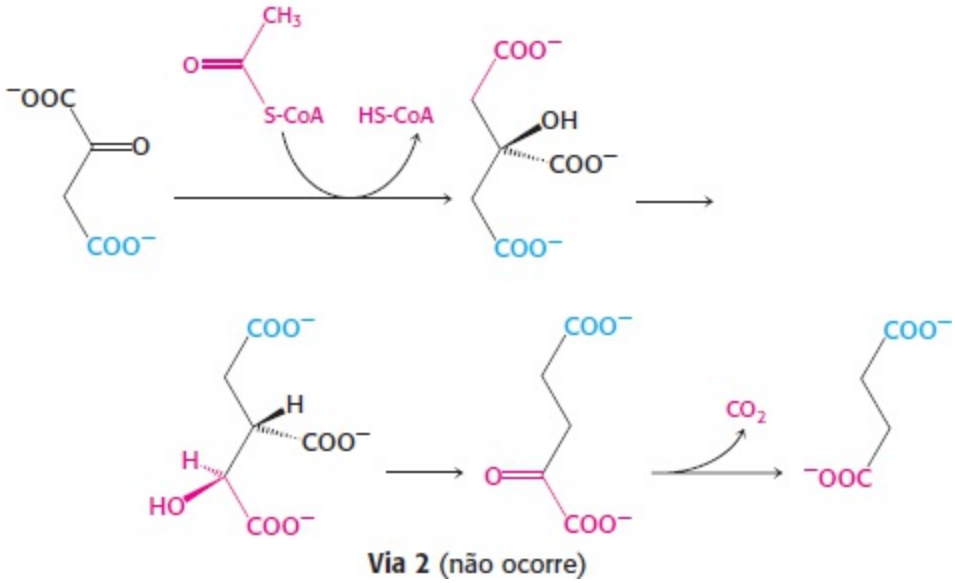
25. A acetil-CoA inibirá o complexo. O metabolismo da glicose em piruvato será alentecido porque acetil-CoA está sendo derivado de uma fonte alternativa.

26. O intermediário enol da acetil-CoA ataca o átomo de carbono carbonil do glioxalato para formar uma ligação C-C. Essa reação é como a condensação de oxaloacetato com o intermediário enol da acetil-CoA na reação catalisada pela citrato sintase. O glioxilato contém um átomo de hidrogênio no lugar do grupamento $-CH_2COO^-$ do oxaloacetato. No restante, as reações são quase idênticas.

27. O citrato é uma molécula simétrica. Portanto, os pesquisadores presumiram que os dois grupamentos $-CH_2COO^-$ do citrato reagiriam de modo idêntico. Eles acreditavam que, para cada molécula de citrato que passasse pelas reações mostradas na via 1, outra molécula de citrato reagiria, como é mostrado na via 2. Se isso acontecesse, apenas *metade* do marcador deveria aparecer no CO_2.

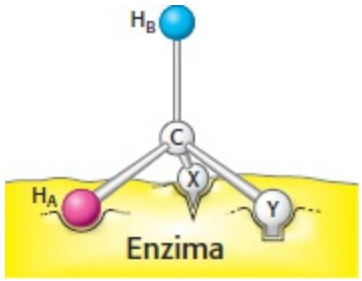


Via 1



Via 2 (não ocorre)

28. Um átomo de hidrogênio será denominado A e o outro, B. Agora, suponha que uma enzima liga três grupamentos desse substrato – X, Y e H – em três locais complementares. O diagrama adiante mostra X, Y e H_A ligados a três pontos na enzima. Em contrapartida, X, Y e H_B não conseguem se ligar a esse local ativo. Dois desses três grupos conseguem se ligar, mas não os três. Assim sendo, H_A e H_B terão destinos diferentes.



Grupamentos estericamente não equivalentes, como H_A e H_B, serão quase sempre diferenciados nas reações enzimáticas. A essência da diferenciação desses grupamentos é que a enzima mantém o substrato em uma orientação específica. A ligação em três pontos, como mostrado no diagrama, é a maneira facilmente visualizada de promover uma orientação específica do substrato, mas não é a única maneira de fazê-lo.

29. (a) A oxidação completa do citrato exige 4,5 μmol de O_2 para cada micromol de citrato.

$$C_6H_8O_7 + 4{,}5\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 4\ H_2O$$

Portanto, 13,5 μmol de O_2 serão consumidos por 3 μmol de citrato. (b) O citrato levou ao consumo de muito mais O_2 do que poderia ser atribuído simplesmente à oxidação do próprio citrato. Assim sendo, o citrato promoveu consumo de O_2.

30. (a) Quando não foi adicionado arsenito, a quantidade de citrato permaneceu constante, mas quando ele foi adicionado, a concentração do citrato caiu, sugerindo que estava sendo metabolizado.

(b) A ação do arsenito não é modificada. O citrato continua desaparecendo.

(c) O arsenito está impedindo a regeneração do citrato. Lembre-se (pp. 521-522) de que o arsenito inibe o complexo piruvato desidrogenase.

31. (a) A infecção inicial não é influenciada pela ausência de isocitrato liase; contudo, a ausência dessa enzima inibe a fase latente da infecção.

(b) Sim

(c) Um examinador poderia afirmar que, no processo de deleção do gene da isocitrato liase, algum outro gene foi danificado e que é a ausência desse outro gene que impede a infecção latente. A reinserção do gene da isocitrato liase nas bactérias de onde foi retirado torna essa afirmativa menos válida.

(d) A isocitrato liase possibilita que as bactérias sintetizem os carboidratos necessários à sobrevida, inclusive os componentes carboidrato da membrana celular.

Capítulo 18

1. Nas fermentações, os compostos orgânicos são doadores, assim como aceptores de elétrons. Na respiração, o doador de elétrons é, geralmente, um componente orgânico, enquanto o aceptor de elétrons é uma molécula inorgânica, como oxigênio.

2. Os bioquímicos utilizam E'_0, o valor no pH 7, enquanto os químicos usam E_0, o valor em 1 M H^+. A linha denota que o pH 7 é o estado padrão.

3. O potencial de redução de $FADH_2$ é menor do que o de NADH (ver Quadro 18.1). Por conseguinte, quando esses elétrons são passados junto com oxigênio, menos energia é liberada. A consequência da diferença é que o fluxo de elétrons de $FADH_2$ para O_2 bombeia menos prótons do que os elétrons de NADH.

4. O $\Delta G^{\circ\prime}$ da redução de oxigênio por $FADH_2$ é –200 kJ mol^{-1} (–48 kcal mol^{-1}).

5. O $\Delta G^{\circ\prime}$ é +67 kJ mol^{-1} (+16,1 kcal mol^{-1}) para oxidação por NAD^+ e –3,8 kJ mol^{-1} (–0,92 kcal mol^{-1}) para oxidação por FAD. A oxidação de FAD por NAD^+ não é termodinamicamente exequível.

6. Piruvato aceita elétrons e, portanto, é o oxidante. NADH doa elétrons e é o redutor.

7. $\Delta G^{\circ\prime} = nF\Delta E'_0$

8. O valor de $\Delta E'_0$ do ferro pode ser alterado por meio de modificação do ambiente do íon.

9. c, e, b, a, d.

10. (a) 4; (b) 3; (c) 1; (d) 5; (e) 2.

11. As 10 unidades de isopreno tornam a coenzima Q solúvel no ambiente hidrofóbico da membrana mitocondrial interna. Os dois átomos de oxigênio conseguem ligar reversivelmente dois elétrons e dois prótons enquanto a molécula passa da forma quinona para a forma quinol.

12. Rotenona: NADH, NADH-oxidorredutase Q serão reduzidos. O restante será oxidado. Antimicina A: NADH, NADH-oxidorredutase Q e coenzima Q serão reduzidos. O restante será oxidado. Cianeto: todos serão oxidados.

13. O complexo I seria reduzido, enquanto os complexos II, III e IV seriam oxidados. O ciclo do ácido cítrico se tornaria reduzido porque não é possível oxidar NADH.

14. O respirassoma é outro exemplo do uso de complexos supramoleculares em bioquímica. O fato de ter os três complexos, que são bombas de prótons, associados entre si aumenta a eficiência do fluxo de elétrons de complexo para complexo. Isso, por sua vez, promove bombeamento de prótons mais eficiente.

15. Radical hidroxila (OH ·), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), íon superóxido (O_2^-) e peróxido (O_2^{2-}). Essas pequenas moléculas reagem com muitas macromoléculas – inclusive proteínas, nucleotídios e membranas – e comprometem a estrutura e a função das células.

16. O ATP é reciclado por processos geradores de ATP, sobretudo fosforilação oxidativa.

17. (a) 12,5; (b) 14; (c) 32; (d) 13,5; (e) 30; (f) 16.

18. (a) Bloqueia o transporte de elétrons e o bombeamento de prótons no complexo IV. (b) Bloqueia o transporte de elétrons e a síntese de ATP ao inibir a troca de ATP e ADP através da membrana mitocondrial interna. (c) Bloqueia o transporte de elétrons e o bombeamento de prótons no complexo I. (d) Bloqueia a síntese de ATP sem inibir o transporte de elétrons por dissipação do gradiente de

prótons. (e) Bloqueia o transporte de elétrons e o bombeamento de prótons no complexo IV. (f) Bloqueia o transporte de elétrons e o bombeamento de prótons no complexo III.

19. Se o gradiente de prótons não for dissipado pelo influxo de prótons em uma mitocôndria com a geração de ATP, a parte externa da mitocôndria acaba desenvolvendo uma carga elétrica positiva tão grande que a cadeia de transporte de elétrons não consegue mais bombear prótons contra o gradiente.

20. As subunidades se chocam em virtude da energia térmica de fundo (movimento browniano). O gradiente de prótons torna mais provável a ocorrência de rotação horária porque essa direção resulta em prótons fluindo a favor de seu gradiente de concentração.

21. Se houver disfunção mitocondrial, a única forma de gerar ATP é por glicólise anaeróbica, que geralmente resulta em acúmulo de ácido láctico no sangue.

22. Se o ADP não conseguir penetrar nas mitocôndrias, a cadeia de transporte de elétrons parará de funcionar porque não haverá aceptor para a energia. NADH acumula-se na matriz. É preciso lembrar que, enquanto o NADH inibe, o NAD^+ é necessário para algumas enzimas do ciclo do ácido cítrico. A glicólise interrompe o funcionamento aeróbico, mas passará para glicólise anaeróbica de modo que NADH possa ser reoxidado a NAD^+ pela lactato desidrogenase.

23. (a) Nenhum efeito; as mitocôndrias não conseguem metabolizar glicose.

(b) Nenhum efeito; não há substrato para impulsionar a síntese de ATP.

(c) A $[O_2]$ cai porque o citrato é um substrato e ATP pode ser formado a partir de ADP e P_i.

(d) O consumo de oxigênio é interrompido porque a oligomicina inibe a síntese de ATP, que está acoplada a atividade da cadeia de transporte de elétrons.

(e) Nenhum efeito, pelos motivos descritos na parte *d*.

(f) A $[O_2]$ cai rapidamente porque o sistema não está acoplado e não demanda síntese de ATP para reduzir a força próton-motora.

(g) A $[O_2]$ cai, embora mais lentamente. A rotenona inibe o complexo I, mas o succinato possibilita que os elétrons entrem no complexo II.

(h) O consumo de oxigênio cessa porque o complexo IV é inibido e toda a cadeia retrocede.

24. (a) A razão P:O é igual ao produto de (H^+/2 e^-) por (P/H^+). Observe que a razão P:O é idêntica à razão P:2 e $^-$. (b) 2,5 e 1,5, respectivamente.

25. O cianeto pode ser fatal porque se liga à forma férrica da citocromo oxidase e, assim, inibe a fosforilação oxidativa. O nitrito converte ferro-hemoglobina em ferri-hemoglobina, que também se liga ao cianeto. Desse modo, a ferri-hemoglobina compete com a citocromo oxidase pelo cianeto. Essa competição é terapeuticamente efetiva porque a quantidade de ferri-hemoglobina que pode ser formada sem comprometer o transporte de oxigênio é muito maior do que a quantidade de citocromo oxidase.

26. Esse defeito (denominado síndrome de Luft) foi observado em uma mulher de 38 anos de idade que não conseguia realizar trabalho físico prolongado. Sua taxa metabólica basal era o dobro do normal, mas sua função tireoidiana era normal. Uma biopsia muscular revelou que as mitocôndrias dessa mulher eram muito variáveis e tinham estrutura atípica. Os estudos bioquímicos revelaram que a oxidação e a fosforilação eram bem acopladas nessas mitocôndrias. Nessa paciente, boa parte da energia era convertida em calor, em vez de ATP.

27. A triose fosfato isomerase converte a di-hidroxiacetona fosfato (uma potencial via sem saída) em gliceraldeído 3-fosfato (um intermediário glicolítico importante).

28. Esse inibidor (como a antimicina A) bloqueia a redução do citocromo c_1 por QH_2, o ponto intermediário.

29. Se a fosforilação oxidativa estivesse desacoplada, não poderia ser produzido ATP. Em uma tentativa inútil de produzir ATP seriam consumidos muitos substratos. O perigo está na dose. O excesso de desacoplamento resultaria em lesão tecidual em órgãos extremamente aeróbicos, como o cérebro e o coração, que teria graves repercussões para o organismo como um todo. A energia que normalmente é transformada em ATP seria liberada como calor. Para manter a temperatura corporal, a sudorese poderia aumentar, embora o próprio processo de sudorese dependa de ATP.

30. Se não for possível a troca de ATP por ADP entre a matriz e as mitocôndrias, a ATP sintase deixará de funcionar porque não existe seu substrato ADP. O gradiente de prótons acaba se tornando tão grande que a energia liberada pela cadeia de transporte de elétrons não é suficiente para bombear prótons contra o gradiente maior que o normal.

31. Adicionar o inibidor com e sem um desacoplador e monitorar a taxa de consumo de O_2. Se o consumo de O_2 aumentar novamente na presença do inibidor e do desacoplador, o inibidor está obrigatoriamente inibindo a ATP sintase. Se o desacoplador não influenciar a inibição, o inibidor está atuando na cadeia de transporte de elétrons.

32. Como os músculos têm demandas energéticas maiores, sobretudo durante o exercício físico, presume-se que precisem de mais ATP. Essa demanda significa que mais locais de fosforilação oxida-tiva são necessários e isso pode ser atendido pelo aumento do número de cristas.

33. O resíduo arginina, que tem carga elétrica positiva, propicia a liberação de prótons pelo ácido aspártico ao estabilizar o aspartato (que tem carga elétrica negativa).

34. 4; 4,7.

35. A ATP sintase bombearia prótons à custa da hidrólise de ATP, mantendo assim a força próton-motriz. A sintase funcionaria como uma ATPase. Existem algumas evidências de que mitocôndrias lesionadas usam essa tática para manter, pelo menos temporariamente, a força próton-motriz.

36. Isso sugere que as mitocôndrias disfuncionais participam do desenvolvimento da doença de Parkinson. Implica especificamente o complexo I.

37. A carga elétrica negativa extra no ATP, em comparação com o ADP, é responsável pela translocação mais rápida do ATP para fora da matriz mitocondrial. Se as diferenças de carga elétrica entre ATP e ADP forem reduzidas pela ligação com Mg^{2+}, o ADP poder competir mais facilmente com ATP pelo transporte para o citoplasma.

38. Quando todo o ADP disponível for convertido em ATP, a ATP sintase não poderá mais atuar. O gradiente de prótons torna-se tão grande que a energia da cadeia de transporte de elétrons não é suficiente para bombear contra o gradiente e, consequentemente, diminuem o consumo de oxigênio e o transporte de elétrons.

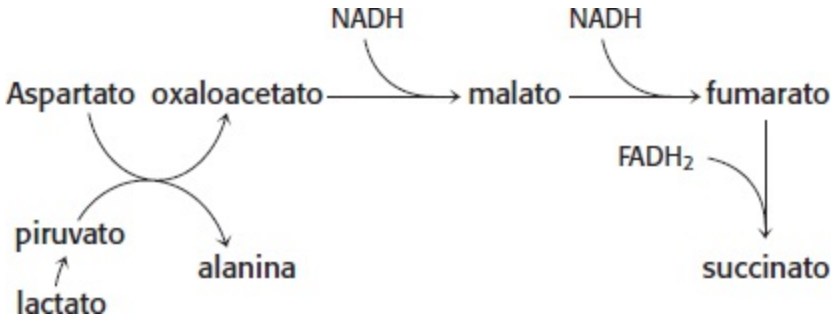
39. O efeito sobre o gradiente de prótons é o mesmo em todos os casos.

40. A exportação de ATP a partir da matriz. Importação de fosfato para a matriz.

41. Lembre-se da discussão sobre reações catalisadas por enzimas na qual foi mencionado que o sentido de uma reação é determinado pela diferença ΔG entre substratos e produtos. Uma enzima acelera a velocidade das reações anterógradas e retrógradas. A hidrólise de ATP é exergônica, e, portanto, a ATP sintase promove a reação hidrolítica.

42. As quinases citoplasmáticas obtêm assim acesso preferencial ao ATP exportado.

43. Os ácidos orgânicos no sangue são indícios de que os camundongos conseguem boa parte de suas demandas energéticas da glicólise anaeróbica. Lactato é o produto final da glicólise anaeróbica. Alanina é uma forma de transporte aminada do lactato. A formação de alanina participa da formação do succinato, que é causada pelo estado reduzido das mitocôndrias.



A cadeia de transporte de elétrons é alentecida porque a membrana mitocondrial interna está hiperpolarizada. Sem ADP para aceitar a energia da força próton-motora, a membrana se torna tão polarizada que os prótons não podem ser bombeados. O excesso de H_2O_2 deve-se, provavelmente, ao fato de que as concentrações do radical superóxido estão mais elevadas porque o oxigênio deixou de ser efetivamente reduzido.

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2\ H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

Na verdade, os camundongos apresentam evidências dessa lesão oxidativa.

44. (a) Vitaminas C e E.

(b) O exercício físico induz a superóxido dismutase, que converte ROS em peróxido de hidrogênio e oxigênio.

(c) A resposta a essa questão ainda não foi plenamente estabelecida. As duas possibilidades são: (1) a supressão de ROS por vitaminas evita a expressão de mais superóxido dismutase e (2) algumas ROS podem ser moléculas sinalizadoras necessárias para estimular as vias de sensibilidade à insulina.

45. (a) O succinato é oxidado pelo complexo II, e os elétrons são usados para produzir a força próton-motora que impulsiona a síntese de ATP.

(b) A capacidade de sintetizar ATP é muito reduzida.

(c) Porque o objetivo era medir a hidrólise de ATP. Se succinato fosse adicionado na presença de ATP, nenhuma reação ocorreria por causa do controle respiratório.

(d) A mutação exerce pouco efeito sobre a capacidade da enzima de catalisar a hidrólise de ATP.

(e) Eles sugerem: (1) que a mutação não influenciou o local catalítico da enzima porque a ATP sintase ainda consegue catalisar a reação reversa e (2) a mutação não influenciou a quantidade de enzima existente visto que os controles e os pacientes apresentaram atividades semelhantes.

46. A configuração absoluta do tiofosfato indica que ocorreu inversão no fósforo na reação catalisada pela ATP sintase. Esse resultado condiz com a ocorrência de uma reação de transferência de fosforila em uma única etapa. A conservação da configuração na reação Ca^{2+} ATPase implica duas reações de transferência de fosforila – inversão pela primeira e retorno à configuração inicial pela segunda reação. A reação Ca^{2+}-ATPase prossegue graças a um intermediário enzimático fosforilado.

Capítulo 19

1. O fotossistema I gera ferredoxina, que reduz $NADP^+$ a NADPH, redutor biossintético. O fotossistema II ativa o complexo manganês, um oxidante que consegue oxidar água, gerando elétrons para fotossíntese e prótons para formar um gradiente de prótons e para reduzir $NADP^+$ e O_2.

2. As reações de fase clara ocorrem nas membranas tilacoides. O aumento da superfície de membrana aumenta o número de locais de geração de ATP e NADH.

3. Esses complexos absorvem mais luz do que o centro de reação sozinho. Os complexos coletores de luz direcionam a luz para os centros de reação.

4. $NADP^+$ é o aceptor. H_2O é o doador. Energia luminosa.

5. O gradiente de carga elétrica, um componente da força prótonmotora nas mitocôndrias, é neutralizado pelo influxo de Mg^{2+} para a luz das membranas tilacoides.

6. A clorofila é prontamente inserida no interior hidrofóbico das membranas tilacoides.

7. Prótons liberados pela oxidação da água; prótons bombeados para a luz pelo complexo do citocromo *bf;* prótons removidos do estroma pela redução de $NADP^+$ e plastoquinona.

8. Fótons com 700 nm têm um conteúdo energético de 172 kJ mol^{-1}. A absorção da luz pelo fotossistema I resulta em um $\Delta E'_0$ de –1,0 V. Lembre-se de que $\Delta G'_0 = nF\Delta E'_0$, com F sendo 96,48 kJ $mol^{-1}V^{-1}$. Em condições padronizadas, a alteração energética dos elétrons é 96,5 kJ. Portanto, a eficiência é 96,5/172 = 56%.

9. O fluxo de elétrons do fotossistema II para o fotossistema I é exergônico. Para esse fluxo exergônico seria necessário consumir ATP, comprometendo o propósito da fotossíntese.

10. $\Delta E'_0$ = 10,11 V e $\Delta G'_0$ = –21,3 kJ mol^{-1} (– 5,1 kcal mol^{-1}).

11. (a) Todos os ecossistemas precisam de uma fonte de energia externa ao sistema porque as fontes de energia química acabam sendo limitadas. A conversão fotossintética da luz solar é um exemplo dessa conversão.

(b) Não. O Sr. Spock diria que outras substâncias químicas além da água podem doar elétrons e prótons.

12. DCMU inibe a transferência de elétrons na conexão entre os fotossistemas I e II. O_2 conseguirá evoluir na presença de DCMU se um aceptor artificial de elétrons, como ferricianeto, conseguir aceitar elétrons de Q.

13. DCMU não exercerá efeito porque bloqueia o fotossistema II e a fotofosforilação cíclica utiliza o fotossistema I e o complexo citocromo *bf*.

14. (a) 120 kJ $einstein^{-1}$ (28,7 kcal $einstein^{-1}$)

(b) 1,24 V

(c) Um fóton com 1.000 nm tem o conteúdo de energia livre de 2,4 moléculas de ATP. É necessário um mínimo de 0,42 fóton para impulsionar a síntese de uma molécula de ATP.

15. A essa distância, a taxa esperada é de um elétron/segundo.

16. A distância dobra e, portanto, a taxa de transferência de energia deve diminuir em um fator de 64 a 640 ps.

17. As cristas.

18. Nos eucariotos, os dois processos ocorrem em organelas especializadas. A fosforilação oxidativa e a fotossíntese dependem de

elétrons de alta energia para gerar ATP. Na fosforilação oxidativa, os elétrons de alta energia provêm dos substratos e são extraídos na forma de NADH. Na fotossíntese, os elétrons de alta energia são gerados pela luz e são capturados na forma de NADPH. Os dois processos usam reações redox para gerar um gradiente de prótons, e as enzimas que convertem o gradiente de prótons em ATP são semelhantes nos dois processos. Tanto na fosforilação oxidativa como na fotossíntese o transporte de elétrons ocorre nas membranas no interior das organelas.

19. É necessário decompor em fatores o NADPH porque é uma molécula rica em energia. Lembre-se do Capítulo 18 que NADH é igual a 2,5 ATP se for oxidado pela cadeia de transporte de elétrons. 12 NADPH = 30 ATP. Dezoito moléculas de ATP são utilizadas diretamente, portanto, o equivalente de 48 moléculas de ATP são necessárias para a síntese de glicose.

20. Tanto a fotossíntese como a respiração celular são impulsionadas pelos elétrons de alta energia que fluem para um estado mais estável. Na respiração celular, os elétrons de alta energia provêm da oxidação de substratos carbono como NADH e $FADH_2$. Eles liberam sua energia à medida que reduzem o oxigênio. Na fotossíntese, os elétrons de alta energia são gerados pela absorção de energia luminosa e encontram estabilidade no fotossistema I e na ferridoxina.

21. Os elétrons fluem através do fotossistema II diretamente para o ferrocianeto. Não são necessárias outras etapas.

22. (a) Tiorredoxina

(b) A enzima de controle não é afetada, mas a atividade da enzima mitocondrial com parte da subunidade γ do cloroplasto aumenta à medida que a concentração de DTT aumenta.

(c) O aumento foi bem maior quando havia tiorredoxina. A tiorredoxina é o redutor natural para a enzima do cloroplasto e, portanto, opera de modo mais eficiente do que DTT, que provavelmente mantém a tioredoxina reduzida.

(d) Parece que sim.

(e) A enzima é suscetível a controle pelo estado redox. Nas células vegetais a tiorredoxina reduzida é gerada pelo fotossistema I. Assim sendo, a enzima está ativa durante a fotossíntese.

(f) Cisteína.

(g) Modificação grupo-específica ou mutagênese sítio-específica.

Capítulo 20

1. O ciclo de Calvin constitui a principal maneira de converter o CO_2 gasoso em matéria orgânica – isto é, biomoléculas. Essencialmente, todos os átomos de carbono de nosso corpo já passaram pela rubisco e pelo ciclo de Calvin em algum momento.

2.

Ciclo de Calvin	**Ciclo de Krebs**
Estroma	Matriz
Química dos carbonos (compostos de carbono) para a fotossíntese	Química dos carbonos para a fosforilação oxidativa
Fixa CO_2	Libera CO_2
Necessita de elétrons de alta energia (NADPH)	Produz elétrons de alta energia (NADH)
Regenera o composto inicial (ribulose 1,5-bifosfato)	Regenera o composto inicial (oxaloacetato)
Necessita de ATP	Produz ATP ou GTP
Estequiometria complexa	Estequiometria simples

3. (a) 3-fosfoglicerato. (b) Os outros membros do ciclo de Calvin.

4. O Estágio 1 refere-se à fixação do CO_2 com ribulose 1,5-bifosfato e formação subsequente de 3-fosfoglicerato. O Estágio 2 consiste na conversão de parte do 3-fosfoglicerato em hexose. O Estágio 3 refere-se à regeneração da ribulose 1,5-bifosfato.

5. A rubisco catalisa uma reação crucial, porém é altamente ineficiente. Por conseguinte, é necessária em grandes quantidades para

superar a sua catálise lenta.

6. Como a formação de carbamato só ocorre na presença de CO_2, essa propriedade impede que a rubisco catalise exclusivamente a reação da oxigenase na ausência de CO_2.

7. Porque o NADPH é produzido nos cloroplastos pelas reações de luz.

8. A concentração de 3-fosfoglicerato aumentaria, enquanto ocorreria diminuição da concentração de ribulose 1,5-bifosfato.

9. A concentração de 3-fosfoglicerato diminuiria, enquanto ocorreria aumento da ribulose 1,5-bifosfato.

10. Aspartato + glioxilato → oxaloacetato + glicina.

11. A atividade de oxigenase da rubisco aumenta com a temperatura. O capim-colchão é uma planta C_4, enquanto a maioria das gramíneas carece dessa capacidade. Como consequência, o capimcolchão se desenvolverá durante a parte mais quente do verão, visto que a via C_4 fornece um suprimento abundante de CO_2.

12. A via C_4 possibilita o aumento da concentração de CO_2 no local de fixação do carbono. O CO_2 em altas concentrações inibe a reação de oxigenase da rubisco. Essa inibição é importante para as plantas tropicais, visto que a atividade de oxigenase aumenta mais rapidamente com a temperatura do que a atividade de carboxilase.

13. O ATP é necessário para formar fosfoenolpiruvato (PEP) a partir do piruvato. O PEP combina-se com o CO_2 para formar oxaloacetato e, subsequentemente, malato. São necessárias duas moléculas de ATP, visto que a segunda molécula é necessária para fosforilar o AMP a ADP.

14. A fotorrespiração refere-se ao consumo de oxigênio pelas plantas, com produção de CO_2, porém sem gerar energia. A fotorrespiração deve-se à atividade de oxigenase da rubisco. Representa um desperdício, visto que, em lugar de fixar o CO_2 para conversão em hexoses, a rubisco produz CO_2.

15. À medida que o aquecimento global progride, as plantas C_4 invadem as latitudes mais altas, enquanto as plantas C_3 buscam refúgio em regiões mais frias.

16. As reações de luz provocam aumento das concentrações de NADPH, de ferredoxina reduzida e Mg^{2+} no estroma, bem como aumento do pH.

17. As enzimas catalisam a transformação do açúcar de cinco carbonos formado pela fase oxidativa da via das pentoses fosfato nos intermediários frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato da glicólise (e da gliconeogênese).

18. A marcação emerge no C-5 da ribulose 5-fosfato.

19. A descarboxilação oxidativa do isocitrato a α-cetoglutarato. Forma-se um intermediário β-cetoácido em ambas as reações.

20. (a) 5 glicose 6-fosfato + ATP →

6 ribose 5-fosfato + ADP + H^+.

(b) Glicose 6-fosfato + 12 $NADP^+$ + 7 H_2O →

6 CO_2 + 12 NADPH + 12 H^+ + P_i.

21. A fase não oxidativa da via das pentoses fosfato pode ser utilizada para converter três moléculas de ribose 5-fosfato em duas moléculas de frutose 6-fosfato e uma molécula de gliceraldeído 3-fosfato. Essas moléculas são componentes da via glicolítica.

22. A conversão da frutose 6-fosfato em frutose 1,6-bifosfato pela fosfofrutoquinase requer a presença de ATP.

23. Quando há necessidade de grandes quantidades de NADPH. A fase oxidativa da via das pentoses fosfato é seguida da fase não oxidativa. A frutose 6-fosfato e o gliceraldeído 3-fosfato formados são utilizados para produzir glicose 6-fosfato pela gliconeogênese, e o ciclo se repete até que o equivalente de uma molécula de glicose seja oxidado a CO_2.

24. As favas contêm pamaquina, um glicosídio purínico que pode levar à produção de peróxidos – espécies reativas de oxigênio que podem causar lesão das membranas e de outras biomoléculas. A glutationa é usada para destoxificar as ROS. A regeneração da glutationa depende de um suprimento adequado de NADPH, que é sintetizado pela fase oxidativa da via das pentoses fosfato. Os indivíduos com baixos níveis de desidrogenase são particularmente suscetíveis à toxicidade da pamaquina.

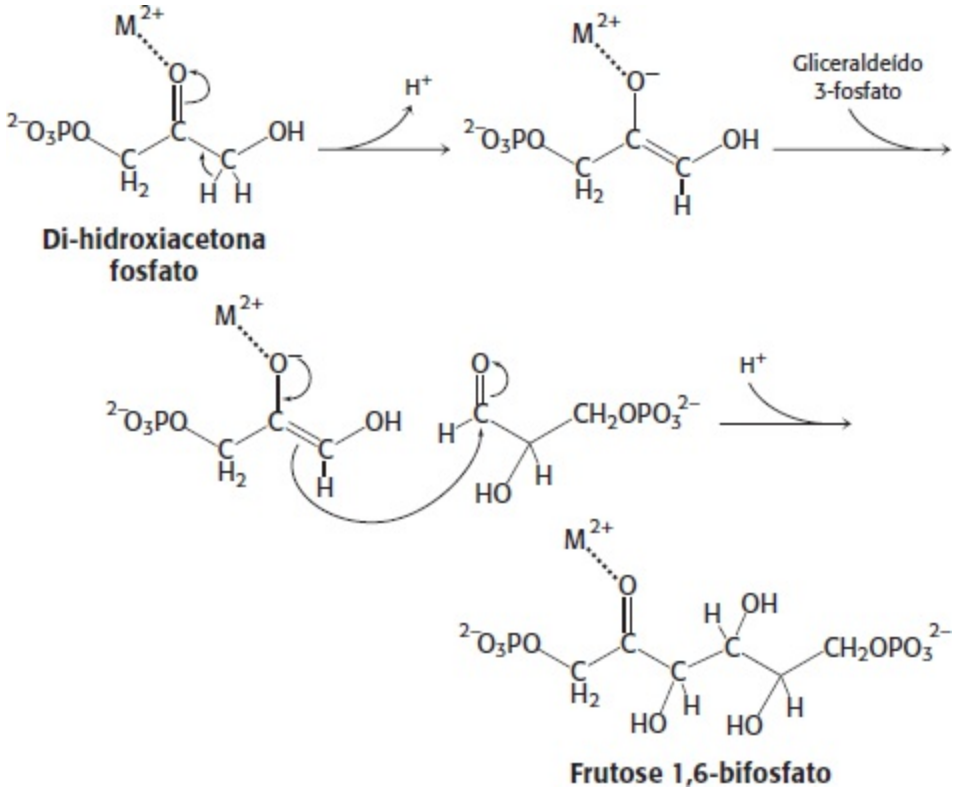
25. Porque os eritrócitos carecem de mitocôndrias, e a via das pentoses fosfato constitui a única maneira de obter NADPH. Existem meios bioquímicos para converter o NADH mitocondrial em NADPH citoplasmático.

26. Os peróxidos reativos constituem um tipo de espécie reativa de oxigênio. A enzima glutationa peroxidase utiliza a glutationa reduzida para neutralizar os peróxidos, convertendo-os em alcoóis, enquanto produz glutationa oxidada. A glutationa reduzida é regenerada pela glutationa redutase na presença de NADPH, o produto da fase oxidativa da via das pentoses fosfato.

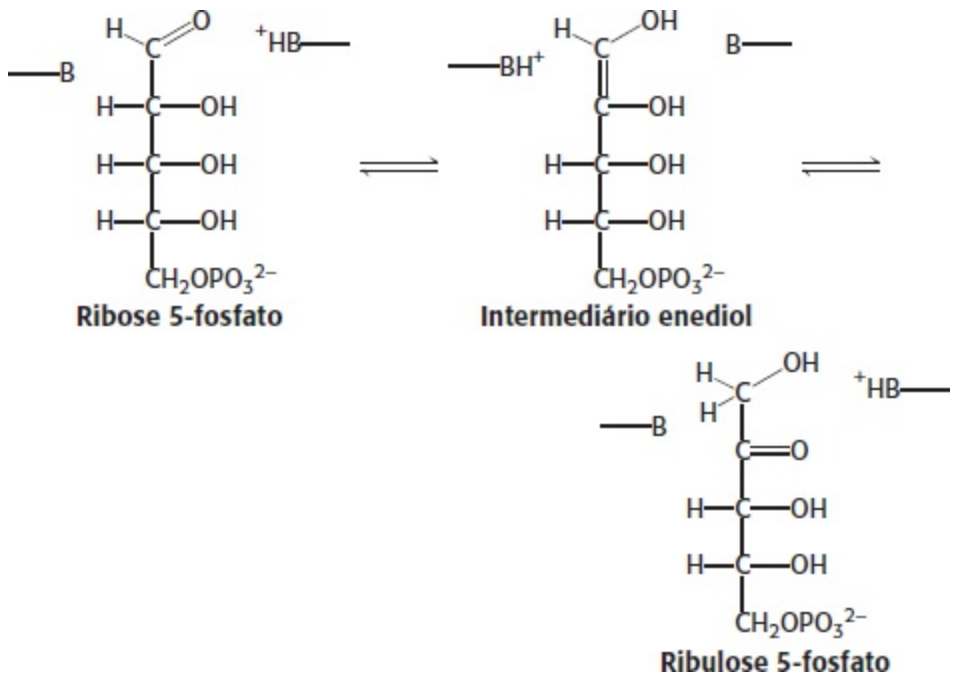
27. Para a redução da glutationa pelo NADPH, $\Delta E'_0$ é de +0,09 V. Por conseguinte, $\Delta G'_0$ é de –17,4 kJ mol^{-1} (–4,2 kcal mol^{-1}), o que

corresponde a uma constante de equilíbrio de 1.126. A razão [NADPH]/[NADP$^+$] necessária é de 8,9 × 10^{-5}.

28.



29.



30. Uma alíquota de um homogeneizado de tecido é incubada com glicose marcada com ^{14}C em C-1, e uma outra alíquota com glicose marcada com ^{14}C em C-6 também é incubada. A radioatividade do CO_2 produzido pelas duas amostras é comparada. A base lógica desse experimento é que apenas o C-1 é descarboxilado pela via das pentoses fosfato, enquanto o C-1 e o C-6 são igualmente descarboxilados quando a glicose é metabolizada pela via glicolítica, pelo complexo da piruvato desidrogenase e pelo ciclo do ácido cítrico. A razão para a equivalência do C-1 e do C-6 no último conjunto de reações é que o gliceraldeído 3-fosfato e a di-hidroxiacetona fosfato são rapidamente interconvertidos pela triose fosfato isomerase.

31. A redução de cada mol de CO_2 para o nível de uma hexose necessita de dois moles de NADPH. A redução do NADP$^+$ é um processo de dois elétrons. Por conseguinte, a formação de dois moles de NADPH exige o bombeamento de quatro moles de elétrons pelo fotossistema I. Os elétrons perdidos pelo fotossistema I são repostos pelo fotossistema II, que precisa absorver um número igual de

fótons. Por conseguinte, são necessários oito fótons para gerar o NADPH necessário. A entrada de energia de oito moles de fótons é de 1.594 kJ (381 kcal). Por conseguinte, a eficiência global da fotossíntese em condições padrões é de pelo menos 477/1.594 ou 30%.

32. Não é violação nem milagre. A equação da p. 584 necessita não apenas de 18 ATP, mas também de 12 NADPH. Esses elétrons, se transferidos para o NAD^+ e utilizados na cadeia de transporte de elétrons, produzirão 30 ATP. Por conseguinte, a síntese de glicose necessita do equivalente de 48 ATP.

33. (a) A curva da direita no gráfico A foi produzida pela planta C_4. Convém lembrar que a atividade de oxigenase da rubisco aumenta com a temperatura mais rapidamente do que a atividade de carboxilase. Em consequência, em temperaturas mais altas, as plantas C_3 devem fixar menos carbono. Como as plantas C_4 podem manter uma maior concentração de CO_2, a elevação da temperatura é menos deletéria.

(b) A atividade de oxigenase predominará. Além disso, quando a elevação da temperatura é muito grande, a evaporação da água pode tornar-se um problema. As temperaturas mais altas também podem começar a danificar as estruturas das proteínas.

(c) A via C_4 é um sistema de transporte ativo muito efetivo para a concentração de CO_2, mesmo quando as concentrações ambientais estão muito baixas.

(d) Com a suposição de que as plantas têm aproximadamente a mesma capacidade de fixar o CO_2, a via C_4 constitui, aparentemente, a etapa limitante de velocidade nas plantas C_4.

Capítulo 21

1. O glicogênio constitui uma reserva importante de energia por vários motivos. A degradação controlada de glicogênio e a liberação de glicose aumentam a quantidade de glicose disponível entre as refeições. Por conseguinte, o glicogênio atua como tampão para manter os níveis de glicemia. O papel do glicogênio na manutenção dos níveis da glicemia é particularmente importante, visto que a glicose constitui praticamente a única fonte de energia utilizada pelo cérebro, exceto durante o jejum prolongado. Além disso, a glicose do glicogênio é prontamente mobilizada e, portanto, constitui uma boa fonte de energia para uma atividade intensa e súbita. Diferentemente dos ácidos graxos, a glicose liberada pode fornecer energia na ausência de oxigênio e, portanto, para a atividade anaeróbica.

2. Como polímero não ramificado, a α-amilose tem apenas uma extremidade não redutora. Por conseguinte, apenas uma molécula de glicogênio fosforilase pode degradar cada molécula de α-amilose. Como o glicogênio é altamente ramificado, existem muitas extremidades não redutoras por molécula. Em consequência, muitas moléculas de fosforilase podem liberar muitas moléculas de glicose por molécula de glicogênio.

3. O paciente apresenta uma deficiência da enzima ramificadora.

4. No músculo, a forma *b* da fosforilase é ativada pelo AMP. No fígado, a forma *a* é inibida pela glicose. A diferença corresponde à diferença do papel metabólico desempenhado pelo glicogênio em cada tecido. O músculo utiliza o glicogênio como fonte de energia para a contração, enquanto o fígado o utiliza para manter os níveis de glicemia.

5. As células mantêm a razão $[P_i]/[\text{glicose 1-fosfato}]$ em mais de 100, favorecendo consideravelmente a fosforólise. Temos aqui um exemplo de como a célula pode alterar a mudança de energia livre para favorecer uma reação que ocorre quando se altera a razão entre substrato e produto.

6. O nível elevado de glicose 6-fosfato na doença de von Gierke, em consequência da ausência da glicose 6-fosfatase ou do transportador, desvia o equilíbrio alostérico da glicogênio sintase fosforilada para a forma ativa.

7. O doador de fosforila é a glicose 1,6-bifosfato, que é formada a partir da glicose 1-fosfato e do ATP, em uma reação catalisada pela fosfoglicoquinase.

8. As diferentes manifestações correspondem às diferentes funções do fígado e do músculo. A glicogênio fosforilase hepática desempenha um papel crucial na manutenção dos níveis de glicemia. Convém lembrar que a glicose é a principal fonte de energia para o cérebro. A glicogênio fosforilase muscular fornece glicose apenas para o músculo e, mesmo nesse caso, somente quando a necessidade energética do músculo encontra-se elevada, como, por exemplo, durante o exercício. A existência de duas doenças diferentes sugerem que há duas isoenzimas diferentes da glicogênio fosforilase – uma isozima específica do fígado e outra específica do músculo.

9. A água é excluída do sítio ativo para impedir a hidrólise. A entrada de água poderia levar à formação de glicose, e não de glicose 1-fosfato. Um experimento de mutagênese de sítio específico é revelador nesse aspecto. Na fosforilase, a Tyr 573 faz uma ponte de hidrogênio com o grupo 2'-OH de um resíduo de glicose. A razão entre glicose 1-fosfato e o produto glicose é de 9.000:1 para a enzima selvagem e de 500:1 para o mutante Phe 573. A construção de um modelo sugere que uma molécula de água ocupa o local normalmente preenchido pelo grupo OH fenólico da tirosina e, em certas ocasiões, ataca o íon oxocarbônio intermediário, formando glicose.

10. A atividade de amilase foi necessária para remover todo o glicogênio da glicogenina. Convém lembrar que a glicogenina sintetiza oligossacarídios de cerca de oito unidades de glicose e, em seguida, a atividade é interrompida. Consequentemente, se os resíduos de

glicose não forem removidos por tratamento extenso com a amilase, a glicogenina não irá funcionar.

11. O substrato pode ser passado diretamente do sítio da transferase para o sítio da enzima desramificadora.

12. Durante o exercício, a [ATP] cai, enquanto ocorre a elevação da [AMP]. Convém lembrar que o AMP é um ativador alostérico da glicogênio fosforilase *b*. Por conseguinte, mesmo na ausência de modificação covalente pela fosforilase quinase, o glicogênio é degradado.

13. Embora a glicose 1-fosfato seja o produto verdadeiro da fosforilase, a glicose 6-fosfato é uma molécula mais versátil em termos de metabolismo. Entre outros destinos, a glicose 6-fosfato pode ser processada, produzindo energia ou unidades básicas de construção. No fígado, a glicose 6-fosfato pode ser convertida em glicose e liberada no sangue.

14. A epinefrina liga-se a seu receptor acoplado à proteína G. As modificações estruturais resultantes ativam uma proteína G_α que, por sua vez, ativa a adenilato ciclase. A adenilato ciclase sintetiza cAMP, que ativa a proteína quinase A. A proteína quinase A ativa, parcialmente a fosforilase quinase, que fosforila e ativa a glicogênio fosforilase. O cálcio liberado durante a contração muscular ativa ainda mais a fosforilase quinase, com consequente estimulação adicional da glicogênio fosforilase.

15. Em primeiro lugar, a via de transdução de sinais é interrompida quando o hormônio iniciador não está mais presente. Em segundo lugar, a atividade de GTPase inerente da proteína G converte o GTP ligado em GDP inativo. Em terceiro lugar, as fosfodiesterases convertem o AMP cíclico em AMP. Em quarto lugar, a PP1 remove o grupo fosforila da glicogênio fosforilase, convertendo a enzima na forma *b* habitualmente inativa.

16. Impede que ambas operem simultaneamente, o que levaria a um gasto inútil de energia. Ver a resposta da questão 24.

17. Todos esses sintomas sugerem problemas do sistema nervoso central. Se o exercício for vigoroso suficiente ou se o atleta não se preparou o suficiente, ou em ambas as circunstâncias, também pode ocorrer a depleção do glicogênio hepático. O cérebro depende da glicose proveniente do glicogênio hepático. Os sintomas sugerem que o cérebro não está obtendo energia suficiente.

18. A fosforilase *a* hepática é inibida pela glicose, que facilita a transição R → T. Essa transição libera PP1, que inativa a degradação de glicogênio e estimula a sua síntese. A fosforilase muscular não é sensível à glicose.

19. A presença de altas concentrações de glicose 6-fosfato indica que a glicose está presente em grandes quantidades e que ela não está sendo usada na glicólise. Por conseguinte, esse valioso recurso é poupado pela sua incorporação no glicogênio.

20. A glicose livre precisa ser fosforilada à custa de uma molécula de ATP. A glicose 6-fosfato derivada de glicogênio é formada por clivagem fosforolítica, poupando, assim, uma molécula de ATP. Por conseguinte, a produção efetiva de ATP quando a glicose derivada do glicogênio é processada a piruvato consiste em três moléculas de ATP, em comparação com duas moléculas de ATP a partir da glicose livre.

21. Degradação: a fosfoglicomutase converte a glicose 1-fosfato, liberada da degradação do glicogênio, em glicose 6-fosfato, que pode ser liberada na forma de glicose livre (fígado) ou processada na glicólise (músculo e fígado). Síntese: converte a glicose 6-fosfato em glicose 1-fosfato, que reage com UTP para formar UDP-glicose, o substrato da glicogênio sintase.

22. Glicogênio$_n$ + P_i → glicogênio$_{n-1}$ + glicose 6-fosfato

Glicose 6-fosfato → glicose 1-fosfato

UTP + glicose 1-fosfato → UDP-glicose + 2 P_i

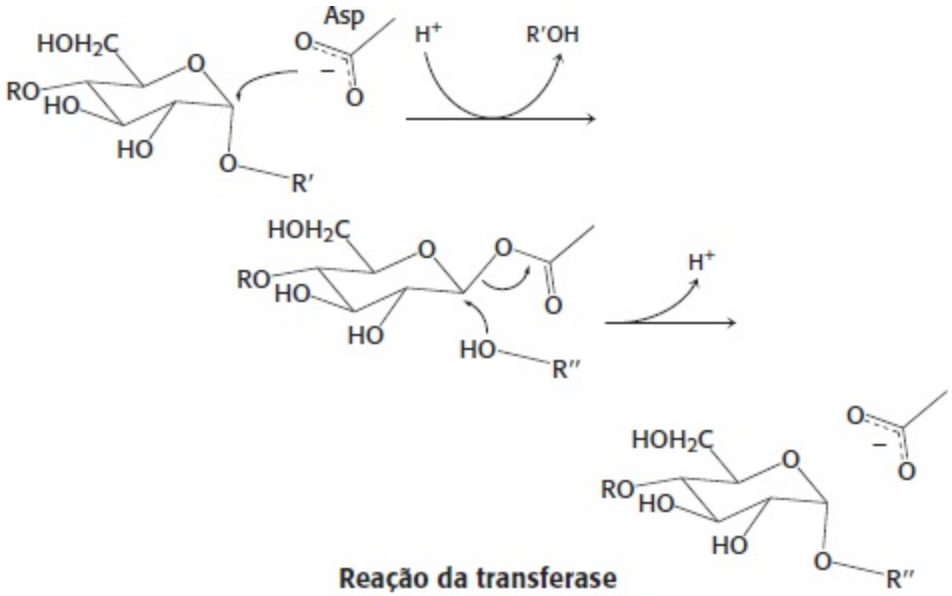
Glicogênio$_{n-1}$ + UDP-glicose → glicogênio$_n$ + UDP

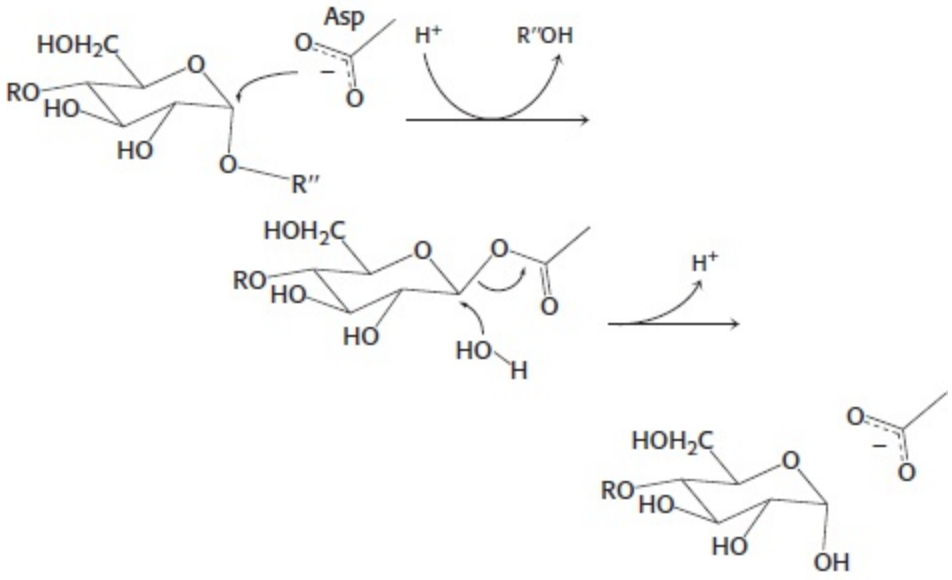
Soma: glicogênio$_n$ + UTP → glicogênio$_n$ + UDP + P_i

23. Em princípio, ter o glicogênio como único iniciador *(primer)* para a síntese subsequente de glicogênio seria uma estratégia bemsucedida. Entretanto, se os grânulos de glicogênio não fossem igualmente divididos entre as células-filhas, as reservas de glicogênio das futuras gerações de células poderiam ser comprometidas. A glicogenina sintetiza o iniciador *(primer)* para a glicogênio sintase.

24. A insulina liga-se a seu receptor e ativa a atividade de tirosina quinase do receptor, o que, por sua vez, desencadeia uma via que ativa proteína quinases. As quinases fosforilam e inativam a glicogênio sintase quinase. Em seguida, a proteína fosfatase 1 remove o fosfato da glicogênio sintase e, assim, ativa a sintase.

25.





26. Galactose + ATP + UTP + H_2O + glicogênio$_n$ → Glicogênio$_{n+1}$ + ADP + UDP + 2 P_i + H^+

27. Fosforilase, transferase, glicosidase, fosfoglicomutase e glicose 6-fosfatase.

28. A glicose é um inibidor alostérico da fosforilase *a*. Por conseguinte, cristais que crescem na sua presença estão no estado T. A adição de glicose 1-fosfato, um substrato, desloca o equilíbrio entre R e T para o estado R. As diferenças conformacionais entre esses estados são suficientemente grandes para que o cristal se desfaça, a não ser que esteja estabilizado por ligações cruzadas.

29. A galactose é convertida em UDP galactose para finalmente formar glicose 6-fosfato.

30. Essa doença também pode ser produzida por uma mutação no gene que codifica o transportador de glicose 6-fosfato. Convém lembrar que a glicose 6-fosfato precisa ser transportada para o lúmen do retículo endoplasmático para ser hidrolisada pela fosfatase. Mutações nas outras três proteínas essenciais desse sistema também podem levar à doença de von Gierke.

31. (a) O glicogênio era demasiado grande para penetrar no gel e, como a analise foi feita por *Western blot* com o uso de um anticorpo específico contra a glicogenina, não se deveria esperar ver proteínas de fundo.

(b) A α-amilase degrada o glicogênio, liberando a glicogenina, uma proteína que pode ser visualizada por *Western blot.*

(c) Glicogênio fosforilase, glicogênio sintase e proteína fosfatase 1. Essas proteínas poderiam ser visíveis se o gel fosse corado para proteína, porém uma análise por *Western blot* revela apenas a presença da glicogenina.

32. (a) O esfregaço foi devido a moléculas de glicogenina com quantidades cada vez maiores de glicogênio fixadas a elas.

(b) Na ausência de glicose no meio, o glicogênio é metabolizado, resultando em perda de material de alto peso molecular.

(c) O glicogênio pode ter sido novamente sintetizado e adicionado à glicogenina quando as células foram novamente expostas à glicose.

(d) A ausência de diferença entre as colunas 3 e 4 sugere que, com 1 h, as moléculas de glicogênio alcançaram um tamanho máximo nessa linhagem celular. A incubação prolongada aparentemente não aumenta a quantidade de glicogênio.

(e) A α-amilase remove essencialmente todo o glicogênio, permanecendo apenas a glicogenina.

Capítulo 22

1. Glicerol + 2 NAD^+ + P_i + ADP →

piruvato + ATP + H_2O + 2 NADH + H^+

Glicerol quinase e glicerol fosfato desidrogenase

2. A reversibilidade imediata deve-se à natureza de alta energia do tioéster na acil-CoA.

3. Para que o AMP retorne a uma forma passível de ser fosforilada pela fosforilação oxidativa ou pela fosforilação ao nível do substrato, outra molécula de ATP precisa ser consumida na reação.

$$ATP + AMP \rightleftarrows 2\ ADP$$

4. b, c, a, g, h, d, e, f.

5. O ciclo do ácido cítrico. As reações que transformam o succinato em oxaloacetato ou o inverso assemelham-se àquelas do metabolismo dos ácidos graxos (Seção 17.2).

6. O penúltimo produto de degradação, a aceto acetil-CoA, produz duas moléculas de acetil-CoA com a tiólise por apenas uma molécula de CoA.

7. O ácido palmítico gera 106 moléculas de ATP. O ácido palmitoleico tem uma dupla ligação com os carbonos C-9 e C-10. Quando o ácido palmitoleico é processado na β-oxidação, uma das etapas da oxidação (para introduzir uma dupla ligação antes da adição de água) não ocorre, visto que já existe uma dupla ligação. Por conseguinte, não há produção de $FADH_2$, e o ácido palmitoleico produz 1,5 molécula de ATP a menos do que o ácido palmítico, com um total de 104,5 moléculas de ATP.

8.

Taxa de ativação para formar acil-CoA	– 2 ATP
Sete voltas para produzir:	
7 acetil-CoA com 10 ATP/acetil-CoA	+ 70 ATP
7 NADH com 2,5 ATP/NADH	+ 17,5 ATP
7 $FADH_2$ com 1,5 ATP/$FADH_2$	+ 10,5 ATP
Propionil-CoA, que requer 1 ATP para sua conversão em succinil-CoA	– 1 ATP
Succinil-CoA →succinato	+ 1 ATP (GTP)
Succinato →fumarato + $FADH^2$	+ 1,5 ATP
$FADH_2$ com 1,5 ATP/$FADH_2$	
Fumarato →malato	
Malato →oxaloacetato + NADH	+ 2,5 ATP
NADH com 2,5 ATP/NADH	
Total	120 ATP

9. Você iria se odiar no dia seguinte, mas pelo menos não teria de se preocupar com a energia. Para a formação de estearil-CoA, é necessário o equivalente a duas moléculas de ATP.

Estearil-CoA + 8 FAD + 8 NAD^+ + 8 CoA + 8 H_2O →

9 acetil-CoA + 8 $FADH_2$ + 8 NADH + 8 H^+

9 acetil-CoA com 10 ATP/acetil-CoA	+ 90 ATP
8 NADH com 2,5 ATP/NADH	+ 20 ATP
8 $FADH_2$ com 1,5 ATP/$FADH_2$	+ 12 ATP
Taxa de ativação	−2,0
Total	122 ATP

10. É preciso ter em mente que, no ciclo do ácido cítrico, 1 molécula de $FADH_2$ produz 1,5 molécula de ATP; 1 molécula de NADH produz 2,5 moléculas de ATP; e 1 molécula de acetil-CoA, 10 moléculas de ATP. São produzidas 2 moléculas de ATP quando a glicose é degradada em 2 moléculas de piruvato. São também produzidas 2 moléculas de NADH, porém os elétrons são transferidos para o $FADH_2$ para entrada nas mitocôndrias. Cada molécula de $FADH_2$ pode gerar 1,5 molécula de ATP. Cada molécula de piruvato produzirá uma molécula de NADH. Cada molécula de acetil-CoA gera 3 moléculas de NADH, 1 molécula de $FADH_2$ e 1 molécula de ATP. Por conseguinte, temos um total de 10 moléculas de ATP para cada acetil-CoA, ou 20 para 2 moléculas de acetil-CoA. O total para a glicose é de 30 moléculas de ATP. É quanto ao ácido hexanoico? O ácido caprioico é ativado em caprioico-CoA à custa de 2 moléculas de ATP, de modo que já perdemos 2 ATP. O primeiro ciclo de β-oxidação gera 1 $FADH_2$, 1 NADH e 1 acetil-CoA. Após a passagem da acetil-CoA pelo ciclo do ácido cítrico, essa etapa terá gerado um total de 14 moléculas de ATP. O segundo ciclo de β-oxidação gera 1 $FADH_2$ e 1 NADH, porém 2 acetil-CoA. Após a passagem da acetil-CoA pelo ciclo do ácido cítrico, essa etapa terá produzido um total de 24 moléculas de ATP. O total é de 36 ATP. Por conseguinte, o ácido caprioico de odor desagradável tem uma produção efetiva de 36 ATP. Por conseguinte, para cada carbono, essa gordura produz 20% mais ATP do que a glicose, uma manifestação do fato de que as gorduras são mais reduzidas do que os carboidratos.

11. Estearato + ATP + 13,5 H_2O + 8 FAD + 8 NAD^+ → 4,5 acetoacetato + 14,5 H^+ + 8 $FADH_2$ + 8 NADH + AMP + 2 P_i

12. O palmitato é ativado e, em seguida, processado pela β-oxida-ção, de acordo com as seguintes reações.

Palmitato + CoA + ATP → palmitoil-CoA + AMP + 2 P_i

Palmitoil-CoA + 7 FAD + 7 NAD + 7 CoASH + H_2O →
8 acetil-CoA + 7 $FADH_2$ + 7 NADH + 7 H^+

As oito moléculas de acetil-CoA combinam-se para formar 4 moléculas de acetoacetato para liberação no sangue, de modo que elas não contribuem para a produção de energia no fígado. Entretanto, o $FADH_2$ e o NADH gerados na preparação da acetil-CoA podem ser processados por fosforilação oxidativa, produzindo ATP.

$$1{,}5 \text{ ATP/FADH}_2 \times 7 = 10{,}5 \text{ ATP}$$

$$2{,}5 \text{ ATP/NADH} \times 7 = 17{,}5 \text{ ATP}$$

O equivalente de 2 ATP foi usado na formação da palmitoil-CoA. Por conseguinte, foram produzidas 26 moléculas de ATP para uso pelo fígado.

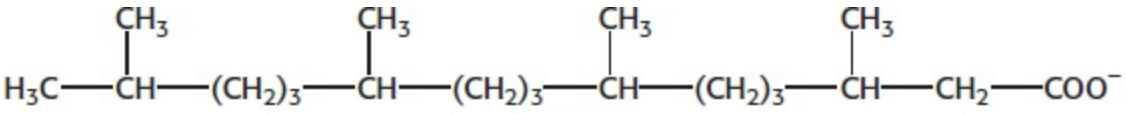
13. NADH produzido com a oxidação a acetoacetato = 2,5 ATP. O acetoacetato é convertido em acetoacetil-CoA.

Duas moléculas de acetil-CoA resultam da hidrólise da acetoacetil-CoA, cada uma com 10 moléculas de ATP quando processada pelo ciclo do ácido cítrico. A produção total de ATP é de 22,5 moléculas.

14. Devido à utilização de uma molécula de succinil-CoA para formar acetoacetil-CoA. A succinil-CoA poderia ser usada para produzir uma molécula de ATP (GTP) de modo que alguém poderia argumentar que a produção é de 21,5 moléculas.

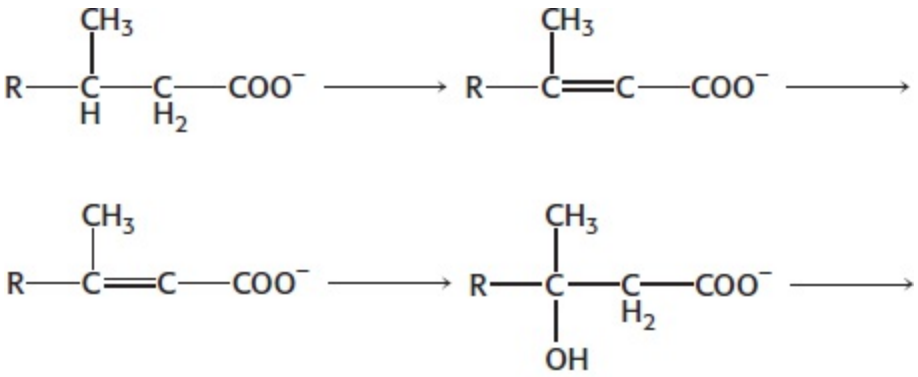
15. Para que as gorduras sejam queimadas, não apenas elas precisam ser convertidas em acetil-CoA, mas também a acetil-CoA precisa ser processada pelo ciclo do ácido cítrico. Para que a acetil-CoA entre no ciclo do ácido cítrico, é necessário um suprimento de oxaloacetato. Este último pode ser formado pelo metabolismo da glicose a piruvato e carboxilação subsequente do piruvato para formar oxaloacetato.

16. (a)



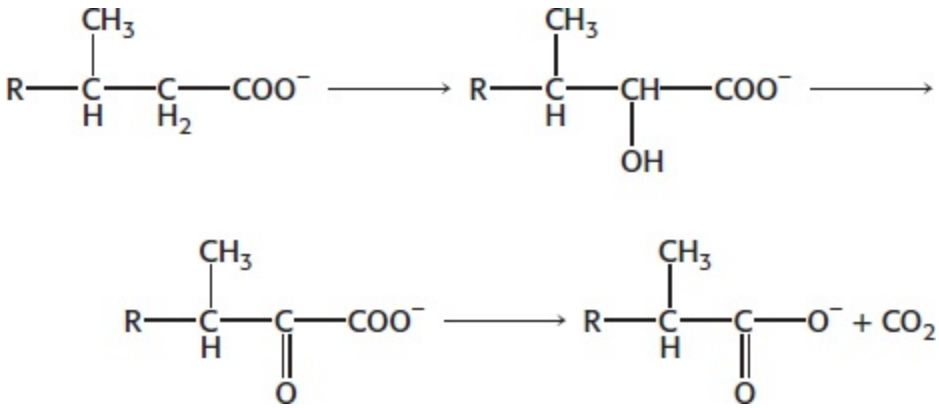
Ácido fitânico

O problema com o ácido fitânico é que, como ele sofre β-oxidação, encontramos o temido átomo de carbono pentavalente. Como o átomo de carbono pentavalente não existe, a β-oxidação não pode ocorrer e há acúmulo de ácido fitânico.



O temido átomo de carbono pentavalente

(b) A remoção de grupos metila, embora teoricamente possível, consumiria muito tempo, e esse procedimento não teria nenhuma sofisticação. O que faríamos com os grupos metila? Nossos fígados solucionaram o problema inventando a α-oxidação.



Um ciclo de α-oxidação, em lugar de β-oxidação, converte o ácido fitânico em um substrato da β-oxidação.

17. A primeira oxidação remove dois átomos de trítio. A hidratação acrescenta H e OH não radioativos. A segunda oxidação remove outro átomo de trítio do átomo de carbono β. A tiólise remove a acetil-CoA com apenas um átomo de trítio, de modo que a razão entre trítio e carbono é de 1/2. Essa razão será a mesma para dois dos acetatos. Entretanto, o último não sofre oxidação, permanecendo todos os átomos de trítio. A razão para esse acetato é de 3/2. A razão para toda a molécula é, portanto, de 5/6.

18. Na ausência de insulina, ocorrerá mobilização dos lipídios até sobrepujar a capacidade do fígado de convertê-los em corpos cetônicos.

19. (a) Oxidação nas mitocôndrias; síntese no citoplasma. (b) Coenzima A na oxidação; proteína carreadora de acil para síntese. (c) FAD e NAD^+ na oxidação; NADPH para síntese. (d) O isômero L da 3-hidroxiacil-CoA na oxidação; o isômero D na síntese. (e) Da carboxila para a metila na oxidação; da metila para a carboxila na síntese. (f) As enzimas da síntese de ácidos graxos, mas não as da oxidação, estão organizadas em um complexo multienzimático.

20. 7 acetil-CoA + 6 ATP + 12 NADPH + 12 H^+ → miristato + 7 CoA + 6 ADP + 6 P_i + 12 $NADP^+$ + 5H_2O.

21. Serão necessárias seis unidades de acetil-CoA. Uma unidade de acetil-CoA será usada diretamente, transformando-se nos dois átomos de carbono mais distantes da extremidade ácida. As outras cinco unidades precisam ser convertidas em malonil-CoA. A síntese de cada molécula de malonil-CoA custa uma molécula de ATP; por conseguinte, serão necessárias 5 moléculas de ATP. Cada ciclo de alongamento necessita de 2 moléculas de NADPH, 1 molécula para reduzir o grupo ceto a um álcool e 1 molécula para reduzir a dupla ligação; assim, serão necessárias 10 moléculas de NADPH. Por conseguinte, serão necessárias 5 moléculas de ATP e 10 moléculas de NADPH para sintetizar o ácido láurico.

22. e, b, d, a, c.

23. Essa mutação inibiria a síntese de ácidos graxos, visto que a enzima cliva o citrato citoplasmático, gerando acetil-CoA para a síntese de ácidos graxos.

24. (a) Falso. A biotina é necessária para a atividade da acetil-CoA carboxilase.

(b) Verdadeiro.

(c) Falso. O ATP é necessário para a síntese de malonil-CoA.

(d) Verdadeiro.

(e) Verdadeiro.

(f) Falso. A ácido graxo sintase é um dímero.

(g) Verdadeiro.

(h) Falso. A acetil-CoA carboxilase é estimulada pelo citrato, que é clivado para produzir o seu substrato, acetil-CoA.

25. Os ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono são sintetizados a partir da propionil ACP (em lugar da acetil ACP) que é formada a partir da propionil-CoA transacetilase.

26. Todos os átomos de carbono marcados serão conservados. Como necessitamos de 8 moléculas de acetil-CoA, e apenas 1 átomo de carbono está marcado no grupo acetila, teremos 8 átomos de carbono marcados. A única acetil-CoA usada diretamente conservará 3 átomos de trítio. As 7 moléculas de acetil-CoA utilizadas para a formação de malonil-CoA perderão 1 átomo de trítio com a adição de CO_2 e outro na etapa de desidratação. Cada uma das 7 moléculas de malonil-CoA conservará 1 átomo de trítio. Por conseguinte, serão conservados, no total, 10 átomos de trítio. A razão entre trítio e carbono é de 1,25.

27. Com uma alimentação rica em ovos crus, a avidina inibirá a síntese de ácidos graxos ao reduzir a quantidade de biotina necessária para a acetil-CoA carboxilase. O cozimento dos ovos provoca desnaturação da avidina, que, portanto, não se ligará à biotina.

28. A única acetil-CoA utilizada diretamente, não na forma de malonil-CoA, fornece os dois átomos de carbono na extremidade ω da cadeia de ácido graxo. Como o ácido palmítico é um ácido graxo C_{16}, a acetil-CoA fornece os carbonos 15 e 16.

29. O HCO_3^- liga-se à acetil-CoA para formar malonil-CoA. Quando esta última se condensa com a acetil-CoA para formar ceto acil-CoA de 4 carbonos, o HCO_3^- é perdido na forma de CO_2.

30. A fosfofrutoquinase controla o fluxo pela via glicolítica. A glicólise funciona para gerar ATP ou unidades básicas de construção para biossíntese, dependendo do tecido. A presença de citrato no citoplasma indica que essas necessidades são atendidas, de modo que a glicose não precisa ser metabolizada.

31. O C-1 é mais radioativo.

32. A enzima mutante será persistentemente ativa, visto que ela não pode ser inibida por fosforilação. A síntese de ácidos graxos será anormalmente ativa. Esse tipo de mutação pode levar à obesidade.

33. (a) Palmitoleato; (b) linoleato; (c) linoleato; (d) oleato; (e) oleato; (f) linolenato.

34. A descarboxilação impulsiona a condensação da malonil ACP com acetil ACP. Em contrapartida, a condensação de duas moléculas de acetil ACP é energeticamente desfavorável. Na gliconeogênese, a descarboxilação impulsiona a formação de fosfoenolpiruvato a partir do oxaloacetato.

35. A mobilização da gordura nos adipócitos é ativada por fosforilação. Por conseguinte, a superprodução da quinase ativada por cAMP levará a uma degradação acelerada de triacilgliceróis e a uma depleção das reservas de gordura.

36. Deficiência de carnitina translocase e deficiência do transportador de glicose 6-fosfato.

37. Na quinta volta da β-oxidação, ocorre formação de cis-Δ^2-enoil-CoA. A desidratação pela hidratase clássica gera D-3-hidroxiacil-CoA, o isômero errado para a próxima enzima da β-oxidação. Essa via sem saída é evitada por uma segunda hidratase, que remove água produzindo trans-Δ^2-enoil-CoA. A adição de água pela hidratase clássica produz então L-3-hidroxiacil-CoA, o isômero apropriado. Por conseguinte, as hidratases com estereoespecificidades opostas servem para *epimerizar* (inverter a configuração) o grupo 3-hidroxila do intermediário da acil-CoA.

38. A probabilidade de sintetizar uma cadeia polipeptídica sem erros diminui à medida que aumenta o comprimento da cadeia. Um único erro pode tornar todo o polipeptídio ineficaz. Em contrapartida, uma subunidade defeituosa pode ser desprezada na formação de um complexo multienzimático não covalente; as subunidades boas não são desperdiçadas.

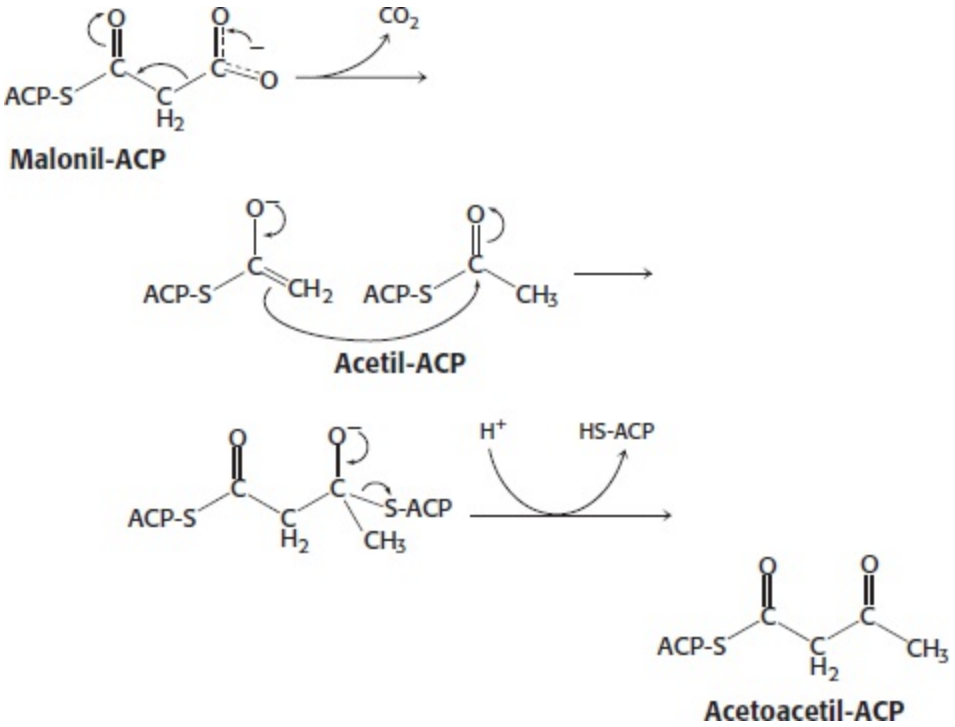
39. A ausência de corpos cetônicos deve-se ao fato de que o fígado, que constitui a fonte de corpos cetônicos no sangue, não pode oxidar ácidos graxos para produzir acetil-CoA. Além disso, devido ao comprometimento da oxidação de ácidos graxos, o fígado torna-se mais dependente da glicose como fonte de energia. Essa dependência resulta em diminuição da gliconeogênese e queda dos níveis de glicemia, que é exacerbada pela ausência de oxidação de ácidos graxos no músculo e aumento subsequente na captação de glicose do sangue.

40. Os peroxissomos intensificam a degradação de ácidos graxos. Em consequência, o aumento da atividade dos peroxissomos poderia ajudar a reduzir os níveis de triglicerídios no sangue. Com efeito, o clofibrato é raramente usado devido à ocorrência de efeitos colaterais graves.

41. O citrato atua para facilitar a formação de filamentos ativos a partir de monômeros inativos. Em essência, ele aumenta o número de sítios ativos disponíveis, ou a concentração da enzima. Em consequência, seu efeito torna-se visível como aumento no valor de $V_{máx.}$. As enzimas alostéricas que alteram os valores de $V_{máx.}$ em resposta a reguladores são algumas vezes denominadas enzimas de classe V. O tipo mais comum de enzima alostérica, com valor de K_m alterado, compreende as enzimas da classe K. A palmitoil-CoA causa despolimerização e, portanto, inativação.

42. O ânion tiolato da CoA ataca o grupo 3-ceto, formando um intermediário tetraédrico. Esse intermediário colapsa para formar acil-CoA e o ânion enolato da acetil-CoA. A protonação do enolato gera acetil-CoA.

43.



44. (a) As gorduras queimam na chama dos carboidratos. Sem carboidrato, não haveria reações anapleuróticas para repor os componentes do ciclo do ácido cítrico. Com uma dieta exclusiva de gorduras, ocorreria acúmulo de acetil-CoA proveniente da degradação de ácidos graxos.

(b) Acetona a partir dos corpos cetônicos.

(c) Sim. Os ácidos graxos de cadeia ímpar levariam à produção de propionil-CoA, que pode ser convertida em succinil-CoA, um componente do ácido cítrico. Serviria para repor o ciclo do ácido cítrico e melhorar a halitose.

45. Uma gordura marcada pode entrar no ciclo do ácido cítrico como acetil-CoA e produzir oxaloacetato marcado, porém somente após a perda de dois átomos de carbono na forma de CO_2. Em consequência, embora o oxaloacetato possa estar marcado, pode não ocorrer nenhuma síntese efetiva de oxaloacetato e, portanto, nenhuma síntese efetiva de glicose ou de glicogênio.

46. (a) $V_{máx.}$ está diminuída, e o valor de K_m, aumentado. $V_{máx.}$ (tipo selvagem) = 13 nmol minuto^{-1} mg^{-1}; K_m (tipo selvagem) = 45 μM; $V_{máx.}$ (mutante) = 8,3 nmol minuto^{-1} mg^{-1}; K_m (mutante) = 74 μM. (b) Ambos, $V_{máx.}$ e K_m, estão diminuídos. $V_{máx.}$ (tipo selvagem) = 41 nmol minuto^{-1} mg^{-1}; K_m (tipo selvagem) = 104 μM; $V_{máx.}$ (mutante) = 23 nmol minuto^{-1} mg^{-1}; K_m (mutante) = 69 μM.

(c) O tipo selvagem é significativamente mais sensível à malonil-CoA.

(d) Quanto à carnitina, o mutante exibe aproximadamente 65% da atividade do tipo selvagem; quanto à palmitoil-CoA, aproximadamente 50% da atividade. Por outro lado, 10 μM de malonil-CoA inibem aproximadamente 80% do tipo selvagem, porém não têm essencialmente nenhum efeito sobre a enzima mutante.

(e) O glutamato parece desempenhar um papel mais proeminente na regulação pela malonil-CoA do que sobre a catálise.

Capítulo 23

1. Quando as proteínas são desnaturadas, todas as ligações peptídicas tornam-se acessíveis às enzimas proteolíticas. Se a estrutura tridimensional de uma proteína for mantida, as enzimas proteolíticas não têm acesso a numerosas ligações peptídicas.

2. Em primeiro lugar, a enzima de ativação da ubiquitina (E1) liga a ubiquitina a um grupo sulfidrila na própria E1. Em seguida, a ubiquitina é transferida para um resíduo de cisteína na enzima de conjugação da ubiquitina (E2) pela E2. A ubiquitina-proteína ligase (E3), que utiliza a E2 ubiquitinada com substrato, transfere a ubiquitina para a proteína-alvo.

3. (a) 7; (b) 4; (c) 2; (d) 10; (e) 5; (f) 3; (g) 9; (h) 1; (i) 6; (j) 8.

4. (a) A atividade de ATPase do proteassoma 26S reside na subunidade 19S. A energia da hidrólise do ATP poderia ser usada para desenovelar o substrato, que é demasiado grande para penetrar no barril catalítico. O ATP também pode ser necessário para a translocação do substrato no barril.

(b) Ela fundamenta a resposta em *a*. Por serem pequenos, os peptídios não precisam ser desenovelados. Além disso, pequenos peptídios provavelmente poderiam entrar de uma só vez, sem necessitar de translocação.

5. (a) Piruvato; (b) Oxaloacetato; (c) α-cetoglutarato; (d) α-cetoisocaproato; (e) fenilpiruvato; (f) hidroxifenilpiruvato.

6. (a) Aspartato + α-cetoglutarato + GTP + ATP + 2 H_2O + NADPH + H^+ → 1/2 glicose + glutamato + CO_2 + ADP + GDP + NAD^+ + 2P_i.

As coenzimas necessárias são o piridoxal fosfato na reação de transaminação e o NAD^+/NADH nas reações redox.

(b) Aspartato + CO_2 + NH_4+ + 3 ATP + NAD+ + 4 H_2O → oxaloacetato + ureia + 2 ADP + 4 P_i + AMP + NADH + H^+

7. No proteassoma eucariótico, as subunidades β distintas exibem especificidades diferentes para o substrato, possibilitando uma degradação mais cuidadosa das proteínas.

8. As seis subunidades provavelmente existem como hetero-hexâmero. Experimentos de ligação cruzada poderiam testar o modelo e ajudar a determinar quais as subunidades adjacentes umas às outras.

9. Tiamina pirofosfato.

10. As aminotransferases transferem o grupo α-amino para o α-cetoglutarato, formando glutamato. O glutamato sofre desaminação oxidativa para formar um íon amônio.

11. Aspartato (oxaloacetato), glutamato (α-cetoglutarato), alanina (piruvato).

12. Serina e treonina.

13. São fontes de energia para o ciclo do ácido cítrico, componentes do ciclo do ácido cítrico ou moléculas que podem ser convertidas em uma fonte de energia para o ciclo do ácido cítrico em uma etapa.

14. Atua como escoadouro de elétrons.

15. Carbamoil fosfato e aspartato.

16. (a) 4; (b) 5; (c) 1; (d) 6; (e) 7; (f) 3; (g) 2.

17. A, arginina; B, citrulina; C, ornitina; D, arginossuccinato. A ordem de aparecimento é a seguinte: C, B, D, E.

18. CO_2 + NH_4+ + 3 ATP + NAD^+ + aspartato + 3 H_2O → ureia + 2 ADP + 2 P_i + AMP + PP_i + NADH + H^+ + oxaloacetato.

São consumidos quatro grupos fosforila de alto potencial de transferência. Entretanto, observe que há produção de NADH se o fumarato for convertido em oxaloacetato. O NADH pode produzir 2,5 moléculas de ATP na cadeia de transporte de elétrons. Se esses ATP forem

considerados, apenas 1,5 grupo fosforila de alto potencial de transferência será consumido.

19. A síntese de fumarato pelo ciclo da ureia é importante, visto que estabelece uma ligação entre o ciclo da ureia e o ciclo de ácido cítrico. O fumarato é hidratado a malato que, por sua vez, é oxidado a oxaloacetato. Este último tem vários destinos possíveis: (1) transaminação a aspartato, (2) conversão em glicose pela via gliconeogênica, (3) condensação com acetil-CoA para formar citrato ou (4) conversão em piruvato. Você pode apostar.

20. Ornitina transcarbamoilase (análoga a PALA; ver Capítulo 10).

21. A amônia poderia levar à aminação do α-cetoglutarato, produzindo uma alta concentração de glutamato de modo desregulado. O α-cetoglutarato para a síntese de glutamato poderia ser removido do ciclo do ácido cítrico, diminuindo, assim, a capacidade respiratória da célula.

22. A análise por espectrometria de massa sugere fortemente a deficiência de três enzimas – piruvato desidrogenase, α-cetoglutarato desidrogenase e desidrogenase de α-cetoácidos de cadeia ramificada. Mais provavelmente, o componente E_3 dessas enzimas está ausente ou defeituoso. Essa suposição poderia ser testada pela purificação das três enzimas e análise de sua capacidade de catalisar a regeneração de lipoamida.

23. Seriam administrados benzoato, fenilacetato e arginina para suplementar uma alimentação com restrição proteica. O nitrogênio apareceria no hipurato, fenilacetil glutamina e na citrulina.

24. O fígado é o tecido principal que capta o nitrogênio na forma de ureia. Se houver lesão hepática (p. ex., por hepatite ou em consequência do consumo excessivo de álcool), a amônia livre é então liberada no sangue.

25. Esse defeito pode ser, em parte, superado com o suprimento de uma quantidade adicional de arginina na alimentação e restrição do aporte total de proteína. No fígado, a arginina é clivada em ureia e ornitina, que então reage com carbamoil fosfato, formando citrulina. Esse intermediário do ciclo da ureia condensase com o aspartato, produzindo argininossuccinato, que é então excretado. Observe que dois átomos de nitrogênio – um proveniente do carbamoil fosfato e outro do aspartato – são eliminados do corpo para cada molécula de arginina fornecida na alimentação. Em essência, o argininossuccinato substitui a ureia no transporte de nitrogênio para fora do organismo. A formação de argininossuccinato remove o nitrogênio, e a restrição da proteína ingerida alivia a acidúria.

26. O aspartame, um éster dipeptídico (metil éster de L-aspartil-L-fenilalanina), é hidrolisado a L-aspartato e L-fenilalanina. A fenilalanina em altos níveis é prejudicial aos indivíduos com fenilcetonúria.

27. O *N*-acetilglutamato é sintetizado a partir da acetil-CoA e glutamato. Mais uma vez, a acetil-CoA atua como doador ativado de acetila. Essa reação é catalisada pela *N*-acetilglutamato sintase.

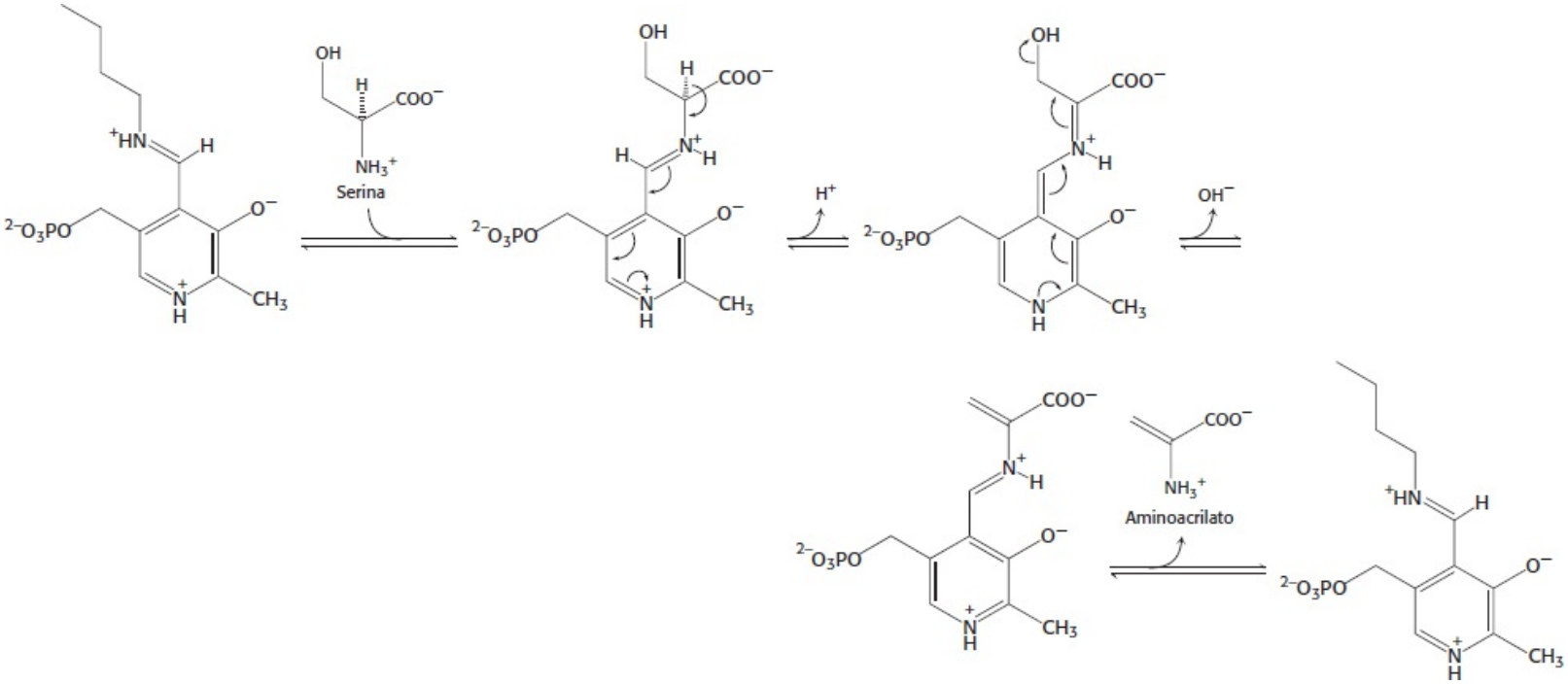
28. As proteínas não são criadas todas da mesma maneira: algumas são mais importantes do que outras. Algumas proteínas seriam degradadas para fornecer o aminoácido ausente. O nitrogênio de outros aminoácidos seria excretado como ureia. Consequentemente, haveria uma maior excreção de nitrogênio do que a sua ingestão.

29. Os esqueletos de carbono dos aminoácidos cetogênicos podem ser convertidos em corpos cetônicos ou ácidos graxos. Apenas a leucina e a lisina são puramente cetogênicas. Os aminoácidos glicogênicos são aqueles cujos esqueletos de carbono podem ser convertidos em glicose.

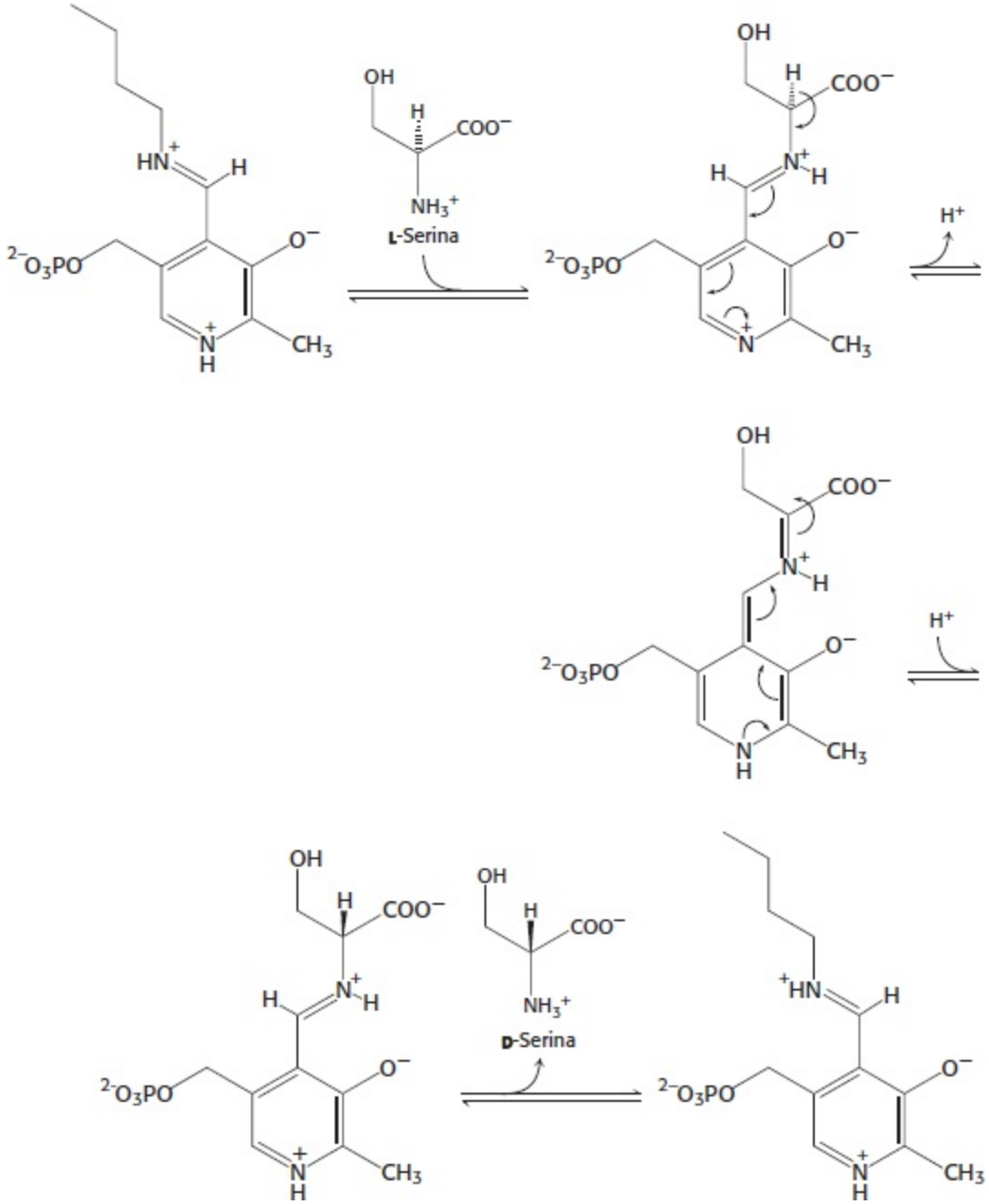
30. Os aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, isoleucina e valina. A enzima necessária é o complexo de desidrogenase de α-cetoácidos de cadeia ramificada.

31. Piruvato (glicólise) e gliconeogênese, acetil-CoA (ciclo do ácido cítrico e síntese de ácidos graxos), acetoacetil-CoA (formação de corpos cetônicos), α-cetoglutarato (ciclo do ácido cítrico), succinil-CoA (ciclo do ácido cítrico), fumarato (ciclo do ácido cítrico) e oxaloacetato (ciclo do ácido cítrico e gliconeogênese).

32.



33.



A constante de equilíbrio para a interconversão da L-serina e D-serina é de exatamente 1.

34. A exposição desse domínio sugere que um componente de um complexo multiproteico não foi formado de modo adequado, ou que um componente foi sintetizado em excesso. Essa exposição leva à rápida degradação e à restauração das estequiometrias apropriadas.

35. (a) Depleção das reservas de glicogênio. Quando essa depleção ocorre, as proteínas precisam ser degradadas para atender às necessidades de glicose do cérebro. Os aminoácidos resultantes são desaminados, e os átomos de nitrogênio são excretados como ureia.

(b) O cérebro adaptou-se ao uso de corpos cetônicos, que provêm do catabolismo dos ácidos graxos. Em outras palavras, o cérebro está sendo alimentado pela degradação dos ácidos graxos.

(c) Quando as reservas de glicogênio e de lipídios estão esgotadas, a única fonte de energia disponível é a proteína.

36. Desaminação a α-ceto-β-metilvalerato; descarboxilação oxidativa a α-metilbutiril-CoA; oxidação a tiglil-CoA; hidratação, oxidação e tiólise, produzindo acetil-CoA e propionil-CoA; propionil-CoA a succinil-CoA.

37. Glicogênio fosforilase. A coenzima atua como catalisador acidobásico.

38. No ciclo de Cori, os átomos de carbono são transferidos do músculo para o fígado na forma de lactato. Para que o lactato possa ser usado, é preciso que seja reduzido a piruvato. Essa redução exige elétrons de alta energia na forma de NADH. Quando os átomos de carbono são transferidos como alanina, a transaminação produz diretamente piruvato.

39. (a) Praticamente nenhuma digestão na ausência de nucleotídios. (b) A digestão de proteínas é acentuadamente estimulada pela presença de ATP. (c) AMP-PNP, um análogo não hidrolisável do ATP, não é mais efetivo do que o ADP. (d) O proteassoma não necessita de ATP nem de PAN para digerir substratos pequenos. (e) O PAN e a hidrólise do ATP podem ser necessários para

desenovelar o peptídio e translocá-lo para dentro do proteassoma. (f) Embora o PAN de *Thermoplasma* não seja tão efetivo com os outros proteassomas, ele resulta em estimulação de 3 a 4 vezes no processo de digestão. (g) Considerando que os *archaea* e os eucariotos divergiram há vários bilhões de anos, a observação de que o PAN de *Thermoplasma* pode estimular o músculo de coelho sugere uma homologia não apenas entre os proteassomas, mas também entre o PAN e a subunidade 19S (mais provavelmente as ATPases) do proteassoma 26S de mamíferos.

Capítulo 24

1. A fixação do nitrogênio refere-se à conversão do N_2 atmosférico em NH_3^+. Os microrganismos diazotróficos (fixadores de nitrogênio) são capazes de fixar o nitrogênio.

2. Oxaloacetato, piruvato, ribose-5-fosfato, fosfoenolpiruvato, eritrose-4-fosfato, α-cetoglutarato e 3-fosfoglicerato.

3. Os seres humanos carecem das vias bioquímicas para sintetizar determinados aminoácidos a partir de precursores mais simples. Consequentemente, esses aminoácidos são "essenciais" e precisam ser obtidos da alimentação.

4. Glicose + 2 ADP + 2 P_i + 2 NAD^+ + 2 glutamato → 2 alanina + 2 α-cetoglutarato + 2 ATP + 2 NADH + 2 H_2O + 2 H^+.

5. N_2 → NH_4^+ → glutamato → serina → glicina → δ-aminolevulinato → porfobilinogênio → heme.

6. Falso. A fixação do nitrogênio é termodinamicamente favorável. A nitrogenase é necessária, visto que o processo é cineticamente desfavorável.

7. Piridoxal fosfato (PLP).

8. *S*-adenosilmetionina, tetra-hidrofolato e metilcobalamina.

9. (a) N^5, N^{10}-metilenotetra-hidrofolato; (b) N^5-metiltetra-hidrofolato.

10. O g-glutamil fosfato é um intermediário provável da reação.

11. A síntese de asparagina a partir do aspartato passa por um intermediário acil-adenilato. Um dos produtos da reação será o AMP marcado com ^{18}O.

12. A administração de glicina leva à formação de isovalerilglicina. Esse conjugado hidrossolúvel, diferentemente do ácido isovalérico, é excretado rapidamente pelos rins.

13. O átomo de nitrogênio em vermelho provém da glutamina. O átomo de carbono em azul provém da serina.

14. As cianobactérias fixam o nitrogênio. Ausência do fotossistema II proporciona um ambiente no qual não há produção de O_2. Convém lembrar que a nitrogenase é rapidamente inativada pelo O_2.

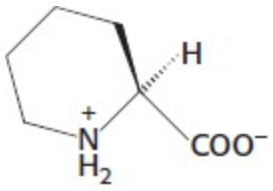
15. O citoplasma é um ambiente redutor, enquanto o meio extracelular é um ambiente oxidante.

16. (a) Nenhum; (b) D-glutamato e oxaloacetato.

17. A succinil-CoA é formada na matriz mitocondrial.

18. Alanina a partir do piruvato; aspartato a partir do oxaloacetato; glutamato a partir do α-cetoglutarato.

19. A lisina ciclodesaminase converte a L-lisina no análogo de prolina com anel de seis membros, também designado como L-homoprolina ou L-pipecolato:



Pipecolato

20. Y poderia inibir a etapa C → D, Z poderia inibir a etapa C → F, e C poderia inibir A → B. Esse esquema é um exemplo de inibição por retroalimentação sequencial. De modo alternativo, Y poderia inibir a etapa C → D, Z poderia inibir a etapa C → F, e a etapa A → B seria inibida apenas na presença de ambos, Y e Z. Esse esquema é denominado inibição por retroalimentação combinada.

21. A velocidade da etapa A → B na presença de altos níveis de Y e Z seria de 24 s^{-1} (0,6 × 0,4 × 100 s^{-1}).

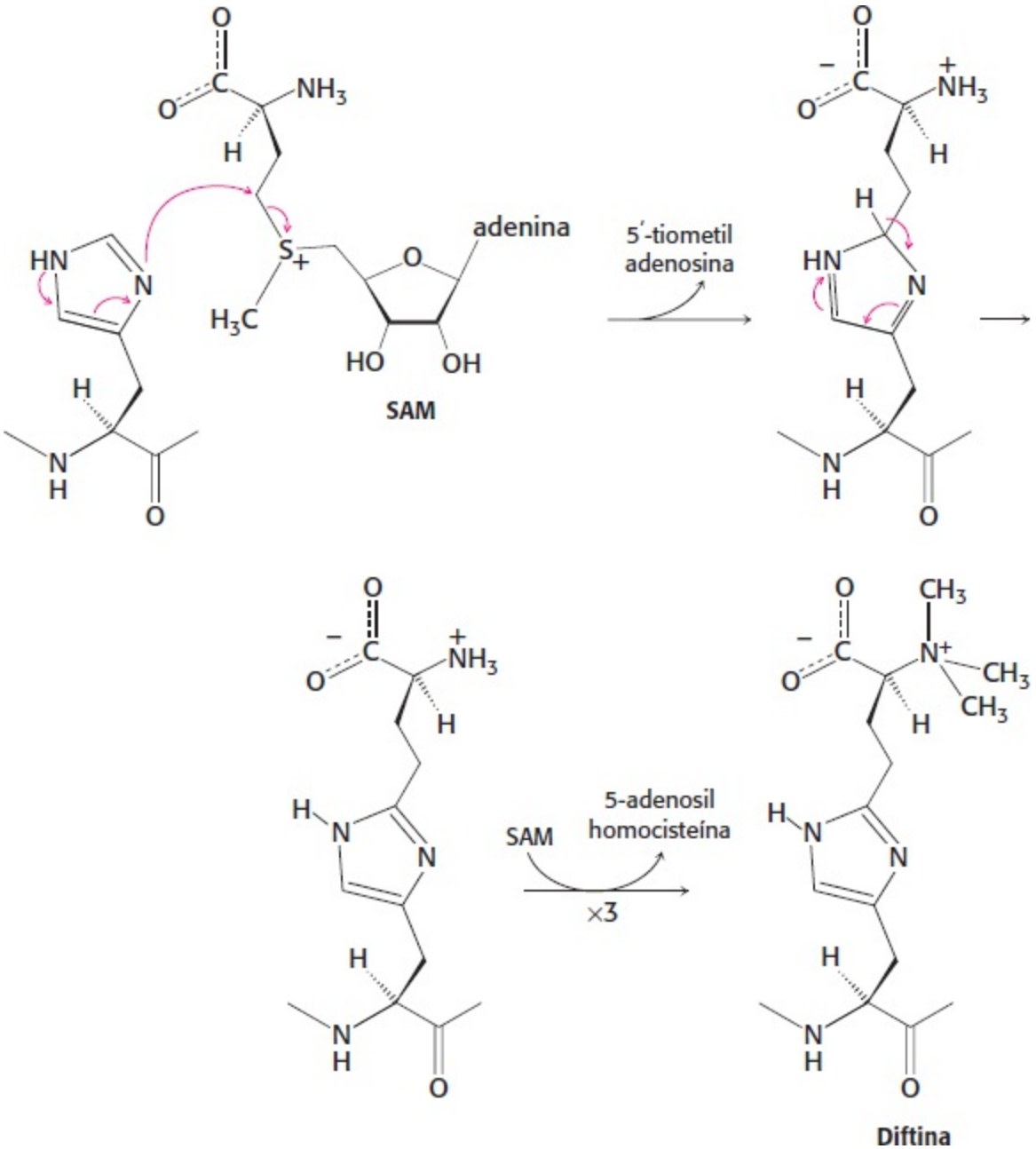
22. A lisina 258 é absolutamente essencial para a atividade da aspartato aminotransferase, visto que é responsável tanto pela formação da aldimina interna com o cofator piridoxal fosfato quanto pela transferência do próton entre os intermediários cetimina e quinonoide. O esperado seria que a mutação desse resíduo para cisteína comprometesse drasticamente a catálise, visto que a cisteína não pode ocupar o mesmo espaço da lisina e também apresenta diferentes propriedades de pK_a. Entretanto, mediante tratamento com 2-bromoetilamina, o

tioéter resultante tem agora uma forma e um valor de pK_a semelhantes aos da cadeia lateral original de lisina. Por conseguinte, há restauração de alguma atividade catalítica.

23. Ocorre formação de uma aldimina externa com SAM, que é desprotonada, formando o intermediário quinonoide. O átomo de carbono desprotonado ataca o átomo de carbono adjacente ao átomo de enxofre, formando o anel de ciclopropano e liberando metiltioadenosina, o outro produto.

24. Ocorre formação de uma aldimina externa com L-serina, que é desprotonada para formar o intermediário quinonoide. Esse intermediário é novamente protonado em sua face oposta, formando uma aldimina com D-serina. Esse composto é clivado, liberando D-serina. A constante de equilíbrio para uma reação de racemização é de 1, visto que o reagente e o produto são imagens especulares exatas um do outro.

25. (a) Na primeira etapa, a histidina ataca o grupo metileno do subgrupo de metionina da SAM (em lugar do substituinte metila habitual), resultando na transferência de um grupo aminocarboxipropila. Três metilações convencionais subsequentes mediadas pela SAM da amina primária produzem a diftina.



(b) Neste capítulo, observamos dois exemplos de uma conversão dependente de ATP de um carboxilato em uma amida: a glutamina sintetase, que utiliza um intermediário acil-fosfato, e a asparagina sintetase, que usa um intermediário acil-adenilato. Ambos os mecanismos são responsáveis pela formação de diftamida a partir da diftina.

26. A síntese a partir do oxaloacetato e do α-cetoglutarato causaria depleção do ciclo do ácido cítrico, o que diminuiria a produção de ATP. Seriam necessárias reações anapleuróticas para reabastecer o ciclo do ácido cítrico.

27. A SAM é o doador para reações de metilação do DNA que protegem o hospedeiro da digestão por suas próprias enzimas de restrição. A ausência de SAM tornaria o DNA bacteriano suscetível à digestão pelas próprias enzimas de restrição da célula.

28. Acetato → acetil-CoA → citrato → isocitrato → α-cetoglutara-to → succinil-CoA

29. (a) A asparagina é muito mais abundante no escuro. Existe maior quantidade de glutamina na presença de luz. Esses aminoácidos exibem os efeitos mais notáveis. A glicina também é mais abundante na luz.

(b) A glutamina é um aminoácido metabolicamente mais reativo, utilizado na síntese de muitos outros compostos. Portanto, quando há energia luminosa disponível, a glutamina é sintetizada preferencialmente. A asparagina, que transporta mais nitrogênio por átomo de carbono e que, portanto, constitui um meio mais eficiente de armazenar nitrogênio quando a energia é escassa, é sintetizada no escuro. A glicina é mais prevalente na luz, devido à fotorrespiração.

(c) O aspargo-branco tem uma concentração particularmente alta de asparagina, que é responsável pelo seu sabor intenso. Todos os aspargos apresentam grande quantidade de asparagina. De fato, como o próprio nome sugere, a asparagina foi inicialmente isolada do aspargo.

Capítulo 25

1. Na síntese *de novo,* os nucleotídios são sintetizados a partir de compostos precursores mais simples, em essência a partir de zero. Nas vias de recuperação, bases pré-formadas são recuperadas e ligadas a riboses.

2. O carbono 2 e o nitrogênio 3 originam-se do carbamoil fosfato. O nitrogênio 1 e os carbonos 4, 5 e 6 provêm do aspartato.

3. Nitrogênio 1: aspartato; carbono 2: N^{10}-formil-tetra-hidrofolato; nitrogênio 3: glutamina; carbonos 4 e 5 e nitrogênio 7: glicina; carbono 6: CO_2; carbono 8: N^{10}-formil-tetra-hidrofolato; nitrogênio 9: glutamina.

4. Forma universal de energia: ATP; transdução de sinais: ATP e GTP; síntese de RNA: ATP, GTP, CTP e UTP; síntese de DNA: dATP, dCTP, dGTP e TTP; componentes de coenzimas: ATP na CoA, FAD e $NAD(P)^+$; síntese de carboidratos: UDP-glicose. Estes são apenas alguns dos usos.

5. Um nucleosídio é uma base fixada a uma ribose. Um nucleotídio é um nucleosídio em que a ribose apresenta um ou mais fosfatos.

6. (a) 9; (b) 7; (c) 6; (d) 10; (e) 2; (f) 4; (g) 1, (h) 11; (i) 8; (j) 3; (k) 5.

7. A canalização de substrato é o processo pelo qual o produto de um sítio ativo se desloca para se tornar um substrato em outro sítio ativo, sem deixar a enzima. Um canal conecta os sítios ativos. A canalização de substrato aumenta acentuadamente a eficiência enzimática e minimiza a difusão de um substrato para um sítio ativo.

8. Glicose + 2 ATP + 2 $NADP^+$ + H_2O → PRPP + CO_2 + ADP + AMP + 2 NADPH + 3 H^+

9. Glutamina + aspartato + CO_2 + 2 ATP + NAD^+ → orotato + 2 ADP + 2 P_i + glutamato + NADH + H^+.

10. (a, c e d) PRPP; (b) carbamoil fosfato.

11. PRPP e formilglicinamida ribonucleotídio.

12. dUMP + serina + NADPH + H^+ → dTMP + $NADP^+$ + glicina

13. Existe uma deficiência de N^{10}-formil-tetra-hidrofolato. A sulfanilamida inibe a síntese de folato ao atuar como análogo do *p*-aminobenzoato, um dos precursores do folato.

14. (a) A célula A não pode crescer em um meio HAT, visto que ela não pode sintetizar TMP a partir de timidina ou de dUMP. A célula B não pode crescer nesse meio, já que ela não pode sintetizar purinas pela via *de novo* ou pela via de recuperação. A célula C consegue crescer em meio HAT, pois ela contém timidina quinase ativa da célula B (possibilitando a fosforilação da timidina a TMP) e hipoxantina-guanina fosforribosil transferase da célula A (possibilitando a síntese de purinas a partir da hipoxantina pela via de recuperação).

(b) Transformar a célula A com um plasmídio contendo genes exógenos de interesse e um gene funcional de timidina quinase. As únicas células que crescerão em meio HAT são as que adquiriram um gene de timidilato quinase; quase todas as células transformadas também conterão os outros genes do plasmídio.

15. A relação de substrato recíproca refere-se ao fato de que a síntese de AMP necessita de GTP, enquanto a síntese de GMP necessita de ATP. Essas necessidades tendem a equilibrar a síntese de ATP e de GTP.

16. O carbono 6 do anel da citosina estará marcado. Na guanina, apenas o carbono 5 estará marcado com ^{13}C.

17. A enzima que utiliza amônia sintetiza carbamoil fosfato para uma reação com ornitina, a primeira etapa do ciclo da ureia. A enzima que utiliza glutamina sintetiza carbamoil fosfato para uso na primeira etapa da biossíntese de pirimidinas.

18. Esses pacientes apresentam um nível elevado de urato, devido à degradação de ácidos nucleicos. O alopurinol impede a formação de cálculos renais e bloqueia outras consequências deletérias da hipe-ruricemia ao impedir a formação de urato.

19. As energias livres de ligação são –57,7 (tipo selvagem), –49,8 (Asn 27) e –38,1 (Ser 27) kJ mol^{-1} (–13,8, –11,9 e –9,1 kcal mol^{-1}, respectivamente). A perda da energia de ligação é de 7,9 kJ mol^{-1} (1,9 kcal mol^{-1}) e 19,7 kJ mol^{-1} (4,7 kcal mol^{-1}).

20. Pode-se administrar inosina ou hipoxantina.

21. N–1 em ambos os casos, e o grupo amino ligado ao C-6 no ATP.

22. Os átomos de nitrogênio 3 e 9 no anel purínico.

23. O alopurinol, um análogo da hipoxantina, é um inibidor suicida da xantina oxidase.

24. Um átomo de oxigênio é acrescentado ao alopurinol, formando aloxantina.

25.

A síntese de carbamoil fosfato utiliza 2 ATP	2 ATP
A formação de PRPP a partir da ribose 5-fosfato 2 ATP produz um AMP*	2 ATP
A conversão de UMP em UTP utiliza 2 ATP	2 ATP
A conversão de UTP em CTP utiliza 1 ATP	1 ATP
Total	7 ATP

* Convém lembrar que o AMP é o equivalente de 2 ATP, visto que é necessário o consumo de 1 ATP para produzir ADP, o substrato para a síntese de ATP.

26. (a) Carboxiaminoimidazol ribonucleotídio; (b) glicinamida ribonucleotídio; (c) fosforribosil amina: (d) formilglicinamida ribonucleotídio.

27. A primeira reação ocorre por fosforilação da glicina, formando um acil-fosfato, seguido de ataque nucleofílico pela amina da fosforribosilamina, deslocando o ortofosfato. A segunda reação consiste em adenilação do grupo carbonila do xantilato, seguida de ataque nucleofílico pela amônia, deslocando o AMP.

28. O grupo $–NH_2$ ataca o átomo de carbono da carbonila, formando um intermediário tetraédrico. A remoção de um próton leva à eliminação de água, formando inosinato.

29. O PRPP é o intermediário ativado na síntese de fosforribosilamina na via *de novo* da formação de purinas; de nucleotídios purínicos a partir de bases livres pela via de recuperação; do orotidilato na formação de pirimidinas; de nicotinato ribonucleotídio; de fosforribosil ATP na via que leva à histidina; e de fosforribosil antranilato na via que leva ao triptofano.

30. (a) cAMP; (b) ATP; (c) UDP-glicose; (d) acetil-CoA; (e) NAD^+, FAD; (f) didesoxinucleotídios; (g) fluorouracila; (h) a CTP inibe a ATCase.

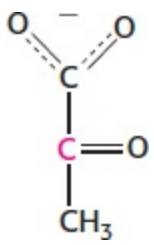
31. Na deficiência de vitamina B_{12}, o metil-tetra-hidrofolato não pode doar o seu grupo metila para a homocisteína para regenerar metionina. Como a síntese de metil-tetra-hidrofolato é irreversível, o tetra-hidrofolato da célula finalmente será convertido nessa forma. Nenhum formil ou metileno-tetra-hidrofo-lato será deixado para a síntese de nucleotídios. A vitamina B_{12} também é necessária para metabolizar a propionil-CoA produzida na oxidação de ácidos graxos de cadeia ímpar e na degradação da metionina.

32. Como o folato é necessário para a síntese de nucleotídios, as células que estão em rápida divisão seriam mais prontamente afetadas. Incluem células do intestino, que são constantemente substituídas, e precursores das células sanguíneas. A ausência de células intestinais e de células sanguíneas explicaria os sintomas frequentemente observados.

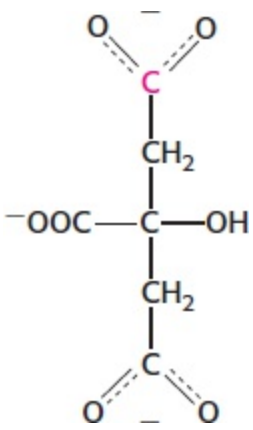
33. O nível de ATP no citoplasma do fígado cai, enquanto o do AMP aumenta acima do normal em todas as três condições. O AMP em excesso é degradado a urato.

34. Succinato → malato → oxaloacetato pelo ciclo do ácido cítrico. Oxaloacetato → aspartato por transaminação, seguida de síntese de pirimidinas. Os carbonos 4, 5 e 6 são marcados.

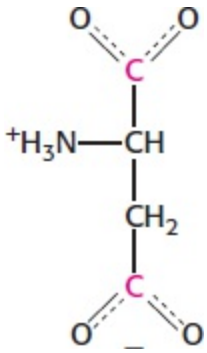
35. A glicose será mais provavelmente convertida em duas moléculas de piruvato, uma das quais estará marcada na posição 2:



Considere agora dois destinos comuns do piruvato – conversão em acetil-CoA e processamento subsequente pelo ciclo do ácido cítrico ou carboxilação pela piruvato carboxilase, formando oxaloacetato. A formação de citrato pela condensação do piruvato marcado com oxaloacetato produzirá citrato marcado:

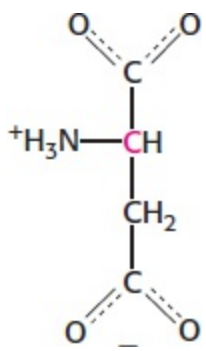


O carbono marcado será conservado durante uma volta do ciclo do ácido cítrico; todavia, com a formação do succinato simétrico, o marcador aparecerá em duas posições diferentes. Por conseguinte, quando o succinato é metabolizado a oxaloacetato, que pode ser aminado para formar aspartato, dois carbonos estarão marcados:



Quando esse aspartato é usado para formar uracila, o COO^- marcado fixado ao carbono a é perdido, e o outro COO^- é incorporado na uracila como carbono 4.

Suponhamos, por outro lado, que o 2-[^{14}C] piruvato marcado seja carboxilado para formar oxaloacetato e processado, formando aspartato. Neste caso, o carbono a do aspartato é marcado.



Quando esse aspartato é usado na síntese de uracila, o marcador está no carbono 6.

36. (a) Algum ATP pode ser recuperado a partir do ADP que está sendo produzido. (b) Existem quantidades iguais de grupos com alto potenciais de transferência de fosforila em cada lado da equação. (c) Como a reação da adenilato quinase está em equilíbrio, a remoção

de AMP levaria à formação de mais ATP. (d) Essencialmente, o ciclo serve como uma reação anaplerótica para a geração do intermediário fumarato do ciclo do ácido cítrico.

37. (i) A formação de 5-aminoididazol-4-carboxamida ribonucleotídio a partir de 5-aminoimidazol-4-(*N*-succinil carboxamida) ribonucleotídio na síntese de IMP. (ii) A formação de AMP a partir de adenilossuccinato. (iii) A formação de arginina a partir de argininossuccinato no ciclo da ureia.

38. O alopurinol é um inibidor da xantina oxidase, que está na via de síntese de urato. No pato de estimação, essa via constitui o meio pelo qual o nitrogênio em excesso é excretado. Se a xantinoxidase fosse inibida no pato, não poderia ocorrer excreção de nitrogênio, com graves consequências, como a morte do animal.

Capítulo 26

1. O glicerol 3-fosfato constitui a base para a síntese de triacilgliceróis e fosfolipídios. O glicerol 3-fosfato é acilado duas vezes para formar fosfatidato. Na síntese de triacilgliceróis, o grupo fosforil é removido do glicerol 3-fosfato para formar diacilglicerol, que é então acilado para formar triacilglicerol. Na síntese de fosfolipídios, o fosfatidato reage comumente com CTP para formar CDP-diacilglicerol, que, em seguida, reage com um álcool para formar um fosfolipídio. De modo alternativo, o diacilglicerol pode reagir com um CDP-álcool, formando um fosfolipídio.

2. O glicerol 3-fosfato é formado principalmente pela redução da di-hidroxiacetona fosfato, um intermediário gliconeogênico, e, em menor grau, pela fosforilação do glicerol.

3. Glicerol + 4 ATP + 3 ácidos graxos + 4 H_2O → triacilglicerol + ADP + 3 AMP + 7 P_i + 4 H^+.

4. Glicerol + 3 ATP + 2 ácidos graxos + 2 H_2O + CTP + etanolamina → fosfatidiletanolamina + CMP + ADP + 2 AMP + 6 P_i + 3 H^+.

5. Três moléculas. Uma molécula de ATP para formar fosforiletanolamina e duas moléculas de ADP para regenerar CTP a partir de CMP.

6. Todos são sintetizados a partir da ceramida. Na esfingomielina, o grupo hidroxila terminal da ceramida é modificado com fosforilcolina. No cerebrosídio, o grupo hidroxila tem uma glicose ou galactose fixada. No gangliosídio, as cadeias oligossacarídicas estão ligadas ao grupo hidroxila.

7. (i) Ativação do diacilglicerol na forma de CDP-DAG. (ii) Ativação do álcool na forma de CDP-álcool. (iii) Uso da reação de troca de bases.

8. (a) CDP-diacilglicerol; (b) CDP-etanolamina; (c) acil-CoA; (d) fosfatidilcolina; (e) UDP-glicose ou UDP-galactose; (f) UDP-galactose; (g) geranil-pirofosfato.

9. Essas mutações são observadas em camundongos. Ocorreria grave diminuição na quantidade de tecido adiposo, visto que não poderia haver formação de diacilglicerol. Normalmente, o diacilglicerol é acilado para formar triacilgliceróis. Na presença de deficiência da atividade da ácido fosfatídico fosfatase, não haveria formação de triacilgliceróis.

10. (i) A síntese de unidades de isopreno ativadas (isopentil pirofosfato), (ii) condensação de seis das unidades de isopreno ativadas para formar o esqualeno, e (iii) ciclização do esqualeno para formar colesterol.

11. A quantidade de redutase e a sua atividade controlam a regulação da biossíntese de colesterol. O controle da transcrição é mediado pela SREBP. A tradução do mRNA da redutase também é controlada. A própria redutase pode sofrer proteólise regulada. Por fim, a atividade da redutase é inibida por fosforilação pela AMP quinase quando os níveis de ATP estão baixos.

12. (a e b) Nenhuma, visto que o marcador é perdido como CO_2.

13. A característica essencial dessa doença genética consiste em níveis elevados de colesterol no sangue, até mesmo em crianças pequenas. O excesso de colesterol é captado pelos macrófagos, resultando, finalmente, na formação de placas e desenvolvimento de doença cardíaca. Existem muitas mutações que causam a doença, porém todas elas levam a uma disfunção do receptor de LDL.

14. As categorias de mutações são as seguintes: (i) nenhum receptor é sintetizado; (ii) os receptores são sintetizados, porém não alcançam a membrana plasmática, porque carecem de sinais para o transporte intracelular ou não ocorre enovelamento apropriado; (iii) os receptores alcançam a superfície da célula, porém não se ligam normalmente à LDL, devido a um defeito no domínio de ligação da LDL; (iv) os receptores alcançam a superfície celular e ligam-se à LDL, porém não se aglomeram nas depressões revestidas, devido a um defeito em suas regiões carboxiterminais.

15. Uma boa resposta seria: “Embora seja verdade que o colesterol é um precursor dos hormônios esteroides, o restante dessa declaração é uma simplificação excessiva. O colesterol é um componente das membranas, e estas literalmente definem as células, e as células compõem os tecidos. Porém dizer que o colesterol ‘produz’ células e tecidos é uma declaração incorreta.”

16. As estatinas são inibidores competitivos da HMG-CoA redutase. São utilizadas como fármacos para inibir a síntese de colesterol em

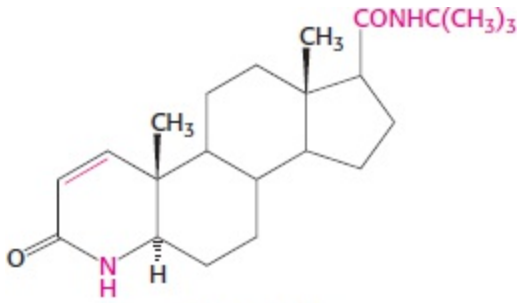
pacientes com níveis elevados de colesterol.

17. Não. O colesterol é essencial para a função das membranas e como precursor dos sais biliares e dos hormônios esteroides. A ausência completa de colesterol seria letal.

18. A desaminação da citidina em uridina modifica CAA (Gln) em UAA (código de parada).

19. A LDL contém apolipoproteína B-100, que se liga a um receptor de LDL na superfície da célula, em uma região conhecida como depressão revestida. Após a ligação, o complexo é internalizado por endocitose, formando uma vesícula interna. A vesícula é separada em dois componentes. Um deles, com o receptor, é transportado de volta à superfície celular e funde-se com a membrana, possibilitando o uso contínuo do receptor. A outra vesícula funde-se com lisossomos no interior da célula. Os ésteres de colesteril são hidrolisados, e o colesterol livre torna-se disponível para uso celular. A proteína da LDL é hidrolisada a aminoácidos livres.

20. A hipertrofia prostática benigna pode ser tratada pela inibição da 5a-redutase. A finasterida, o análogo 4-azaesteroide da di-hidrotestosterona, inibe competitivamente a redutase, porém não atua nos receptores de androgênios. Pacientes em uso de finasterida apresentam níveis plasmáticos acentuadamente mais baixos de di-hidrotestosterona e níveis quase normais de testosterona. A próstata torna-se menor, enquanto os processos dependentes de testosterona, como a fertilidade, a libido e a força muscular, não parecem ser afetados.



Finasterida

21. Os pacientes que são mais sensíveis à debrisoquina apresentam deficiência de uma enzima hepática do citocromo P450 codificada por um membro da subfamília *CYP2*. Essa característica é herdada como caráter autossômico recessivo. A capacidade de degradar outros fármacos pode estar comprometida em indivíduos que hidroxilam lentamente a debrisoquina, visto que uma única enzima do citocromo P450 processa habitualmente uma ampla gama de substratos.

22. Muitas substâncias odorantes hidrofóbicas são desativadas por hidroxilação. O oxigênio molecular é ativado por uma mono-oxigenase do citocromo P450. O NADPH atua como redutor. Um átomo de oxigênio do O_2 vai para o substrato odorante, enquanto o outro é reduzido a água.

23. Convém lembrar que a di-hidrotestosterona é crucial para o desenvolvimento das características masculinas no embrião. Se uma gestante fosse exposta a Propecia, a 5a-redutase do embrião masculina seria inibida, o que poderia resultar em graves anormalidades de desenvolvimento.

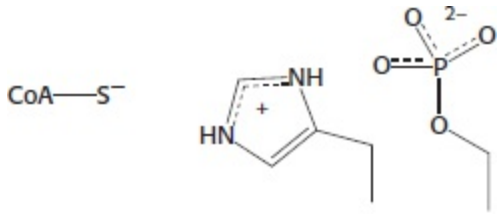
24. As reações de oxigenação catalisadas pela família do citocromo P450 possibilitam uma maior flexibilidade no processo de biossíntese. Como as plantas não são móveis, elas devem depender de defesas físicas, como os espinhos, e de defesas químicas, como os alcaloides tóxicos. A maior variedade do citocromo P450 possibilita uma maior versatilidade de biossíntese.

25. Esse conhecimento faria com que os médicos pudessem caracterizar a probabilidade de um paciente de apresentar uma reação medicamentosa adversa ou de ser suscetível a doenças induzidas por substâncias químicas. Além disso, possibilitaria um esquema de tratamento farmacológico personalizado e particularmente efetivo para doenças como o câncer.

26. As abelhas podem ser particularmente sensíveis a toxinas ambientais, incluindo pesticidas, visto que essas substâncias químicas não são prontamente desintoxicadas, devido à baixa quantidade do sistema do citocromo P450.

27. A estrutura central de um esteroide é constituída de quatro anéis fundidos: três anéis de ciclo-hexano e um anel de ciclopentano. Na vitamina D, o anel B é clivado pela luz ultravioleta.

28. O resíduo de fosfosserina de carga negativa interage com o resíduo de histidina protonada de carga positiva e diminui a sua capacidade de transferir um próton para o tiolato.



His

29. O grupo metila é inicialmente hidroxilado. A hidroximetilamina elimina formaldeído para formar a metilamina.

30. Observe que um nucleotídio de citidina desempenha o mesmo papel na síntese desses fosfoglicerídios que um nucleotídio de uridina na formação do glicogênio (Seção 21.4). Em todos esses processos de biossíntese, ocorre formação de um intermediário ativado (UDP-glicose, CDP-diacilglicerol ou CDP-álcool) a partir de um substrato fosforilado (glicose 1-fosfato, fosfatidato ou fosforil-álcool) e um nucleosídio trifosfato (UTP ou CTP). Em seguida, o intermediário ativado reage com um grupo hidroxila (a extremidade terminal do glicogênio, a cadeia lateral de serina ou um diacilglicerol).

31. A ligação das cadeias laterais isoprenoides confere um caráter hidrofóbico. As proteínas que apresentam esse tipo de modificação são endereçadas para as membranas.

32. A 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA também é um precursor para a síntese de corpos cetônicos. Se houver necessidade de uma fonte de energia em outra parte do corpo, como poderia ocorrer durante o jejum, a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA será convertida na cetona, acetoacetato. Se as necessidades de energia forem atendidas, o fígado irá sintetizar colesterol.

33. Uma maneira pela qual a fosfatidilcolina pode ser sintetizada consiste na adição de três grupos metila à fosfatidiletanolamina. O doador de metila é uma forma modificada de metionina, a S-adenosilmetionina ou SAM (Seção 24.2).

34. O citrato é transportado para fora das mitocôndrias em ocasiões de abundância. A ATP-citrato liase produz acetil-CoA e oxaloacetato. Em seguida, a acetil-CoA pode ser usada para a síntese de colesterol.

35. (a) Não existe nenhum efeito. (b) Como a actina não é controlada pela colesterol, a quantidade isolada deve ser a mesma em ambos os grupos do experimento; a observação de uma diferença deve sugerir algum problema no isolamento do RNA. (c) A presença de colesterol na alimentação diminui drasticamente a quantidade da proteína HMG-CoA redutase. (d) Uma maneira comum de regular a quantidade de uma proteína presente consiste em regular a transcrição, o que claramente não é o caso desta questão. (e) A tradução do mRNA poderia ser inibida, e a proteína poderia ser rapidamente degradada.

Capítulo 27

1. O tecido adiposo é atualmente conhecido como um órgão endócrino ativo, que secreta moléculas de sinalização, denominadas adipocinas.

2. A homeostasia calórica é a condição na qual o gasto energético de um organismo é igual ao aporte de energia.

3. Leptina e insulina.

4. A CCK produz uma sensação de saciedade e estimula a secreção de enzimas digestivas pelo pâncreas e a secreção de sais biliares pela vesícula biliar. O GLP-1 também produz uma sensação de saciedade; além disso, potencializa a secreção de insulina das células β do pâncreas induzida pela glicose.

5. Obviamente, algo está errado. Embora não se conheça a resposta, a via de sinalização da leptina parece ser inibida por supressores da sinalização de citocinas, as proteínas reguladoras.

6. 1: a, b; 2: f; 3: c, d, f; 4: c, d; 5: c, 6: f; 7: e; 8: e; 9: e.

7. Fosforilação da glicose alimentar após a sua entrada no fígado; gliconeogênese; degradação do glicogênio.

8. O diabetes tipo 1 é devido à destruição autoimune das células do pâncreas produtoras de insulina. O diabetes tipo 1 também é denominado diabetes insulinodependente, visto que acomete indivíduos que necessitam de insulina para sobreviver. O diabetes tipo 2 caracteriza-se por resistência à insulina. A insulina é produzida, porém os tecidos que deveriam responder a ela, como o músculo, não o fazem.

9. A leptina estimula processos que estão comprometidos no diabetes. Por exemplo, a leptina estimula a oxidação de ácidos graxos, inibe a síntese de triacilgliceróis e aumenta a sensibilidade do músculo e do fígado à insulina.

10. (a) Um watt é igual a 1 joule (J) por segundo (0,239 caloria por segundo). Por conseguinte, 70 W são equivalentes a 0,07 kJ s^{-1} (0,017 kcal s^{-1}).

(b) Um watt é uma corrente de 1 ampere (A) através de um potencial de 1 volt (V). Para simplificar, pressuponhamos que todos os

elétrons fluem do NADH para o O_2 (uma queda de potencial de 1,14 V). Por conseguinte, a corrente é de 61,4 A, o que corresponde a $3{,}86 \times 10^{20}$ elétrons por segundo (1 A = 1 coulomb s^{-1} = $6{,}28 \times 10^{18}$ cargas s^{-1}).

(c) São formadas cerca de 2,5 moléculas de ATP por molécula de NADH oxidada (dois elétrons). Por conseguinte, ocorre formação de uma molécula de ATP por 0,8 elétron transferidos. Assim, um fluxo de $3{,}86 \times 10^{20}$ elétrons por segundo leva à produção de $4{,}83 \times 10^{20}$ moléculas de ATP por segundo ou 0,80 mmol s^{-1}.

(d) O peso molecular do ATP é de 507. O conteúdo corporal total de ATP de 50 g é igual a 0,099mol. Por conseguinte, a renovação do ATP é de cerca de uma vez em 125 segundos quando o corpo está em repouso.

11. (a) A estequiometria da oxidação completa da glicose é

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$$

e a do tripalmitoilglicerol é

$$C_{51}H_{98}O_2 + 72.5\ O_2 \rightarrow 51\ CO_2 + 49\ H_2O$$

Por conseguinte, os valores do QR são, respectivamente, de 1,0 e 0,703.

(b) Um valor de QR revela o uso relativo de carboidratos e lipídios como fonte de energia. O QR de um corredor de maratona tipicamente diminui de 0,97 para 0,77 durante uma corrida. A diminuição do QR indica o desvio da fonte de energia dos carboidratos para os lipídios.

12. Um grama de glicose (peso molecular de 180,2) é igual a 5,55 mmoles, e um grama de tripalmitoilglicerol (peso molecular de 807,3) é igual a 1,24 mmol. A estequiometria das reações (ver Questão 11) indica que 6 moles de H_2O são produzidos por mol de glicose oxidada, enquanto 49 moles de H_2O são produzidos por mol de tripalmitoilglicerol oxidado. Por conseguinte, a produção de H_2O por grama de substrato energético é de 33,3 mmoles (0,6 g) para a glicose e de 60,8 mmoles (1,09 g) para o tripalmitoilglicerol. Assim, a oxidação completa desse lipídio fornece 1,82 vez mais água do que a glicose. Outra vantagem dos triacilgliceróis é que eles podem ser armazenados em uma forma essencialmente anidra, enquanto a glicose é armazenada como glicogênio, um polímero altamente hidratado. Uma corcova constituída principalmente de glicogênio seria uma carga intolerável.

13. O ciclo de fome-saciedade é o ciclo hormonal noturno que os seres humanos apresentam durante o sono e a alimentação. O ciclo mantém quantidades adequadas de glicose no sangue. A parte de fome do ciclo – o sono – caracteriza-se pela secreção aumentada de glucagon e diminuição da secreção de insulina. Depois de uma refeição, a secreção de glucagon cai, enquanto a da insulina aumenta.

14. O etanol é oxidado pela álcool desidrogenase a acetaldeído, que é então oxidado a acetato acetaldeído. O etanol também é metabolizado a acetaldeído pelo sistema MEOS com depleção subsequente de NADPH.

15. Primeiramente, ocorre o desenvolvimento de fígado gorduroso devido às quantidades aumentadas de NADH que inibem a oxidação de ácidos graxos e estimulam a sua síntese. Em segundo lugar, surge a hepatite alcoólica em decorrência de lesão oxidativa e dano, devido ao excesso de acetaldeído que leva à morte das células. Por fim, há formação de tecido fibroso, criando cicatrizes que comprometem o fluxo sanguíneo e a função bioquímica. A amônia não pode ser convertida em ureia, e a sua toxicidade resulta em coma e morte.

16. Uma macadâmia típica apresenta massa de cerca de 2 g. Como ela é constituída principalmente de lipídios (cerca de 37 kJ g^{-1}, cerca de 9 kcal g^{-1}), uma dessas nozes tem um valor de cerca de 75 kJ (18 kcal). A ingestão de 10 nozes resulta em um aporte de cerca de 753 kJ (180 kcal). Conforme assinalado na resposta à questão 10, o consumo de 1 W de potência corresponde a 1 J s^{-1} (0,239 cal s^{-1}), de modo que 400 W de corrida necessitam de 0,4 kJ s^{-1} (0,0956 kcal s^{-1}. Por conseguinte, uma pessoa teria de correr 1.882 s ou cerca de 31 min para gastar as calorias fornecidas por 10 macadâmias.

17. Um elevado nível de glicemia deflagra a secreção de insulina, que estimula a síntese de glicogênio e de triacilgliceróis. Um nível elevado de insulina impediria a mobilização das reservas energéticas durante a maratona.

18. A falta de tecido adiposo leva ao acúmulo de gorduras no músculo, com desenvolvimento de resistência à insulina. O experimento mostra que as adipocinas secretadas pelo tecido adiposo – neste caso, leptina, facilitam de alguma maneira a ação da insulina no músculo.

19. Essa mutação aumentaria a fosforilação do receptor de insulina e IRS no músculo, melhorando a sensibilidade à insulina. Com efeito, a PTP1B seria um alvo terapêutico atraente para o diabetes tipo 2.

20. A mobilização de lipídios pode ocorrer tão rapidamente a ponto de exceder a capacidade do fígado de oxidar os lipídios ou de convertê-los em corpos cetônicos. O excesso é reesterificado e liberado no sangue, na forma de VLDL.

21. Um dos papéis do fígado consiste em fornecer glicose a outros tecidos. No fígado, a glicólise não é utilizada para a produção de energia, mas para fins de biossíntese. Em consequência, na presença de glucagon, a glicólise hepática é interrompida, de modo que a

glicose possa ser liberada no sangue.

22. Ciclo da ureia e gliconeogênese.

23. (a) A insulina inibe a utilização de lipídios.

(b) A insulina estimula a síntese de proteínas, porém não há aminoácidos na alimentação das crianças. Além disso, a insulina inibe a degradação de proteínas. Como consequência, as proteínas do músculo não podem ser degradadas e utilizadas para a síntese de proteínas essenciais.

(c) Como as proteínas não podem ser sintetizadas, a osmolalidade do sangue é muito baixa. Em consequência, o líquido sai do sangue. Uma proteína particularmente importante para a manutenção da osmolalidade do sangue é a albumina.

24. Durante o exercício vigoroso, o músculo converte a glicose em piruvato através da glicólise. Parte do piruvato é processada pela respiração celular. Entretanto, outra parte é convertida em lactato, que é liberado no sangue. O fígado capta o lactato e o converte em glicose por meio da gliconeogênese. O músculo pode processar aerobicamente os esqueletos de carbono dos aminoácidos de cadeia ramificada. O nitrogênio desses aminoácidos é transferido para o piruvato, formando alanina, que é liberada no sangue e captada pelo fígado. Após transaminação do grupo amino a α-cetoglutarato, o piruvato resultante é convertido em glicose. Por fim, o glicogênio muscular pode ser mobilizado, e a glicose liberada pode ser utilizada pelo músculo.

25. Essa conversão faz com que o músculo possa funcionar em condições anaeróbicas. O NAD^+ é regenerado quando o piruvato é reduzido a lactato, de modo que a energia pode continuar sendo extraída da glicose durante o exercício vigoroso. O fígado converte o lactato em glicose.

26. Ácidos graxos e glicose, respectivamente.

27. Essa prática é denominada sobrecarga de carboidratos. A depleção das reservas de glicogênio inicialmente faz com que os músculos sintetizem uma grande quantidade de glicogênio quando são fornecidos carboidratos alimentares, levando à supercompensação das reservas de glicogênio.

28. O consumo de oxigênio ao final do exercício é utilizado para repor o ATP e a creatina fosfato e para oxidar qualquer lactato produzido.

29. O oxigênio é utilizado na fosforilação oxidativa para a nova síntese de ATP e creatina fosfato. O fígado converte o lactato liberado pelo músculo em glicose. O sangue precisa circular para que a temperatura corporal retorne ao normal, de modo que o coração não pode voltar imediatamente à sua frequência de repouso. A hemoglobina precisa ser reoxigenada para repor o oxigênio utilizado durante o exercício. Os músculos que acionam a respiração devem continuar trabalhando, ao mesmo tempo que os músculos exercitados estão retornando ao estado de repouso. Em essência, todos os sistemas bioquímicos ativados no exercício intenso necessitam de uma quantidade maior de oxigênio para retornar ao estado de repouso.

30. O etanol pode substituir a água ligada por pontes de hidrogênio às proteínas e superfícies de membranas. Essa alteração do estado de hidratação da proteína alteraria a sua conformação e, portanto, a sua função. O etanol também pode alterar o acondicionamento de fosfolipídios nas membranas. Os dois efeitos sugerem que as proteínas integrais de membranas devem ser mais sensíveis ao etanol, como parece realmente ocorrer.

31. As células das fibras tipo I seriam ricas em mitocôndrias, enquanto as das fibras tipo II teriam poucas mitocôndrias.

32. (a) O ATP gasto durante essa corrida equivale a cerca de 8.380 kg. (b) O ciclista precisaria de cerca de 1.260.000.000 dólares para completar a corrida.

33. 25 kg = 25.000 g = ganho ponderal total

$$40 \text{ anos} \times 365 \text{ dias ano}^{-1} = 14.600 \text{ dias}$$
$$25.000 \text{ g}/14.600 \text{ dias} = 1{,}7 \text{ g dia}^{-1}$$

o que equivale a uma rodela adicional de manteiga por dia. O seu IMC é de 26,5, de modo que ela seria considerada dentro da faixa de sobrepeso, mas não de obesidade.

34. O exercício aumenta acentuadamente a necessidade de ATP das células musculares. Para suprir mais eficientemente essas necessidades, ocorre síntese de mais mitocôndrias.

35. A incapacidade das mitocôndrias do músculo de processar todos os ácidos graxos produzidos pela superalimentação leva a níveis excessivos de diacilglicerol e ceramida no citoplasma dos músculos. Esses segundos mensageiros ativam enzimas que comprometem a sinalização da insulina.

36. Ambos se devem a uma falta de tiamina (vitamina B_1). A tiamina, que algumas vezes é denominada aneurina, é necessária, mais notavelmente, para o funcionamento apropriado da piruvato desidrogenase.

37. (a) Os eritrócitos sempre produzem lactato, e as fibras musculares de contração rápida (ver Questão 31) também produzem uma grande quantidade de lactato.

(b) Nesse estágio, o atleta começa a efetuar exercício anaeróbico, durante o qual a maior parte da energia é produzida por glicólise anaeróbica.

(c) O limiar do lactato é essencialmente o ponto em que o atleta passa do exercício aeróbico, que pode ser realizado por longos períodos de tempo, para o exercício anaeróbico, essencialmente corrida de velocidade, que pode ser efetuado apenas por curtos períodos de tempo. A ideia é correr no máximo de sua capacidade aeróbica até que a linha de chegada esteja visível e, em seguida, passar para a condição anaeróbica.

(d) O treinamento aumenta a quantidade de vasos sanguíneos e a quantidade de mitocôndrias no músculo. Ambos os efeitos aumentam a capacidade de processamento aeróbico da glicose. Consequentemente, pode ser feito maior esforço antes de passar para a produção de energia anaeróbica.

Capítulo 28

1. A DNA polimerase I utiliza desoxirribonucleosídio trifosfatos; o pirofosfato é o grupo que sai. A DNA ligase usa DNA-adenilato (AMP unido ao grupo fosforila 5') como parceiro de reação; o AMP é o grupo que sai. A topoisomerase I utiliza um intermediário DNA-tirosila (grupo fosforila 5' ligado ao grupo OH fenólico); o resíduo de tirosina da enzima é o grupo que sai.

2. O superespiralamento positivo resiste ao desenrolamento do DNA. A temperatura de fusão aumenta do DNA superespiralado negativo para o relaxado e para o DNA superespiralado positivo. O superespiralamento positivo constitui, provavelmente, uma adaptação à temperatura alta.

3. Os nucleotídios utilizados para a síntese de DNA apresentam o trifosfato ligado ao grupo hidroxila 5', com grupos hidroxila 3' livres. Esses nucleotídios só podem ser utilizados para a síntese de DNA de 5' para 3'.

4. A replicação do DNA necessita de RNA iniciadores *(primers).* Na ausência de ribonucleotídios apropriados, esses *primers* não podem ser sintetizados.

5. Esse contato íntimo impede a incorporação de ribonucleotídios, em lugar de 2'-desoxirribonucleotídios.

6. (a) 96,2 revoluções por segundo (1.000 nucleotídios por segundo divididos por 10,4 nucleotídios por giro para o B-DNA produzem 96,2 rps). (b) 0,34 μm s^{-1} (1.000 nucleotídios por segundo correspondem a 3.400 Å s^{-1}, visto que a distância axial entre os nucleotídios no B-DNA é de 3,4 Å).

7. Por fim, o DNA ficaria tão fortemente enrolado que o movimento do complexo de replicação seria energeticamente impossível.

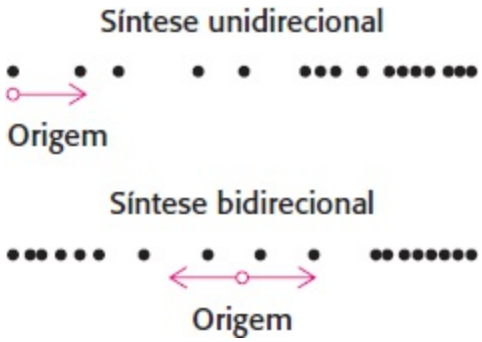
8. Número de ligação $Lk = Tw + Wr = 48 + 3 = 51$. Se $Tw = 50$, $Wr = 1$.

9. Uma característica essencial da maioria das células cancerosas é a divisão celular prolífica, que requer a replicação do DNA. Se a telomerase não fosse ativada, os cromossomos se encurtariam até se tornarem não funcionais, levando à morte da célula.

10. Não.

11. Tratar o DNA rapidamente com endonuclease para, em certas ocasiões, cortar cada fita. Acrescentar a polimerase aos dNTP radioativos. Na ligação quebrada ou corte, a polimerase degradará a fita existente com sua atividade de exonuclease 5' → 3' e a substituirá por uma cópia complementar radioativa, utilizando a sua atividade de polimerase. Esse esquema de reação é designado como "transferência de corte" *(nick translation),* visto que o corte é movido ou transferido ao longo da molécula de DNA sem nunca ser selado.

12. Se a replicação fosse unidirecional, seriam vistos rastros com baixa densidade de grãos em uma extremidade e alta intensidade de grãos na outra extremidade. Por outro lado, se a replicação fosse bidirecional, o meio de um rastro teria baixa densidade, como mostra o diagrama anexo. Para *E. coli,* o rastro de grãos é mais denso em ambas as extremidades do que no meio, indicando que a replicação é bidirecional.



13. (a) Pro (CCC), Ser (UCC), Leu (CUC) e Phe (UUC). De modo alternativo, a última base de cada um desses códons poderia ser U.

(b) Ácido nitroso.

14. São evitadas reações colaterais potencialmente deletérias. A própria enzima poderia ser danificada pela luz se pudesse ser ativada pela luz na ausência de DNA ligado contendo um dímero de pirimidina.

15. As extremidades livres de DNA que aparecem na ausência de telômeros são reparadas por fusão do DNA.

16. A energia livre da hidrólise do ATP em condições padrões é de –30,5 kJ mol^{-1} (–7,3 kcal mol^{-1}). Em princípio, poderia ser usada para romper três pares de bases.

17. A oxidação da guanina levaria ao reparo do DNA. A clivagem da fita de DNA poderia possibilitar a formação de alça das regiões de repetição de tripletes e a expansão dos tripletes.

18. A liberação da DNA topoisomerase II após a enzima ter atuado em seu substrato de DNA requer a hidrólise de ATP. O superespiralamento negativo requer apenas a ligação de ATP, e não a sua hidrólise.

19. (a) Tamanho; a parte superior é relaxada, enquanto a inferior consiste em DNA superespiralado. (b) Topoisômeros. (c) O DNA está se tornando progressivamente mais desenrolado ou relaxado e, portanto, com movimento mais lento.

20. (a) Foi usada para determinar o número de revertentes espontâneos – isto é, a taxa básica de mutação.

(b) Para determinar com segurança que o sistema estava funcionando. A incapacidade de um agente mutagênico conhecido de produzir revertentes indicaria que algo está errado com o sistema experimental.

(c) A própria substância química tem pouca capacidade mutagênica, porém é aparentemente ativada a um agente mutagênico pelo homogeneizado de fígado.

(d) Sistema do citocromo P450.

Capítulo 29

1. A sequência da fita codificante (+, senso) é

5'-ATGGGGAACAGCAAGAGTGGGGCCCTGTCCAAGGAG-3'

e a sequência da fita-molde (–, antissenso) é

3'-TACCCCTTGTCGTTCTCACCCCGGGACAGGTTCCTC-5'

2. Um erro irá afetar apenas uma molécula de mRNA entre muitas sintetizadas a partir de um gene. Além disso, os erros não se tornam uma parte permanente da informação do genoma.

3. Em qualquer momento determinado, apenas uma fração do genoma (DNA total) está sendo transcrita. Em consequência, a velocidade não é essencial.

4. Os sítios ativos estão relacionados com a evolução convergente.

5. A heparina, um glicosaminoglicano, é altamente aniônica. Suas cargas negativas, como as pontes fosfodiéster dos moldes de DNA, possibilita a sua ligação aos resíduos de lisina e de arginina da RNA polimerase.

6. Esse σ mutante irá inibir competitivamente a ligação da holoenzima e também irá impedir a iniciação específica das cadeias de RNA nos sítios promotores.

7. O cerne da enzima sem σ liga-se mais firmemente ao molde de DNA do que a holoenzima. A retenção de σ após a iniciação da cadeia tornaria a RNA polimerase mutante menos processiva. Por conseguinte, a síntese de RNA seria muito mais lenta do que o normal.

8. Uma proteína de 100 kDa contém cerca de 910 resíduos, que são codificados por 2.730 nucleotídios. Na velocidade máxima de transcrição de 50 nucleotídios por segundo, o mRNA seria sintetizado em 54,6 s.

9. A RNA polimerase desliza rapidamente ao longo do DNA, em lugar de simplesmente se difundir pelo espaço tridimensional.

10. O sítio de iniciação está em vermelho:

5'-GCCGTTGACACCGTTCGGCGATCGATCCGCTATAATGTGTGGATCCGCTT-3'

11. A iniciação nos promotores fortes ocorre a cada 2 s. Nesse intervalo, são transcritos 100 nucleotídios. Por conseguinte, os centros das bolhas de transcrição estão distantes de 34 nm (340 Å).

12. (a) A banda mais inferior no gel será a da fita 3 isolada (i), enquanto a banda mais alta será a das fitas 1, 2 e 3 e cerne da polimerase (v). A banda ii estará na mesma posição que a banda i, pois o RNA não é complementar à fita não molde, enquanto a banda iii estará mais alta, visto que há formação de um complexo entre o RNA e a fita-molde. A banda iv será mais alta do que as outras, visto que a fita 1 forma um complexo com 2, e a fita 2 é complexada com 3. A banda v é a mais alta, já que o cerne da polimerase associa-se às três fitas.

(b) Nenhum, pois a rifampicina atua antes da formação do complexo aberto.

(c) A RNA polimerase é processiva. Quando o molde está ligado, a heparina não pode entrar no sítio de ligação do DNA.

(d) Na ausência de GTP, a síntese é interrompida quando o primeiro resíduo de citosina a jusante da bolha é encontrado na fita-molde. Em contraste, quando todos os quatro nucleosídios trifosfatos estão presentes, a síntese prossegue até o final do molde.

13. A RNA polimerase deve retroceder antes da clivagem, resultando em produtos dinucleotídios.

14. A energia de pareamento de bases dos híbridos de di- e trinucleotídios DNA-RNA formados no início da transcrição não é suficiente para impedir a separação das fitas e a perda do produto.

15. (a) Como a cordicepina carece de um grupo 3'-OH, ela não pode participar na formação da ligação 3' → 5'. (b) Como a cauda poli(A) consiste em um longo segmento de adenosina nucleotídios, a possibilidade de incorporação de uma molécula de cordicepina é maior do que na maioria dos RNA. (c) Sim, deve ser convertida em cordicepina 5'-trifosfato.

16. Existem $2^8 = 256$ produtos possíveis.

17. A relação entre as sequências –10 e –35 poderia ser afetada por tensão torcional. O fato de que a topoisomerase II introduz superespirais negativas no DNA impede que essa enzima estimule excessivamente a expressão de seu próprio gene.

18. Ser-Ile-Phe-His-Pro-terminação

19. Uma mutação que comprometa a sequência normal de reconhecimento AAUAAA para a endonuclease poderia explicar esse achado. De fato, uma mudança de U para C nessa sequência causou esse defeito em um paciente com talassemia. A clivagem ocorreu em AAUAAA, 900 nucleotídios a jusante a esse sítio AACAAA mutante.

20. Uma possibilidade é que a extremidade 3' da fita doadora poli(U) clive a ligação fosfodiéster no lado 5' do sítio de inserção. O terminal 3' recém-formado da fita aceptora cliva, então, a fita poli(U) no lado 5' do nucleotídio que iniciou o ataque. Em outras palavras, um resíduo de uridina poderia ser acrescentado por duas reações de transesterificação. Esse mecanismo postulado assemelha-se ao do *splicing* do RNA.

21. *Splicing* alternativo e edição do DNA. A modificação covalente das proteínas subsequentes à síntese acentua ainda mais a complexidade.

22. Ligação de uma sequência oligo(dT) ou oligo(U) a um suporte inerte para criar uma coluna de afinidade. Quando o RNA passa pela coluna, apenas o RNA contendo poli(A) é retido.

23. (a) Há quantidades diferentes de RNA para os vários genes. (b) Embora todos os tecidos tenham os mesmos genes, estes são expressos em graus diferentes nos vários tecidos. (c) Esses genes são denominados genes de manutenção *(housekeeping genes)* expressos pela maioria dos tecidos. Podem incluir genes para as enzimas da glicólise ou do ciclo do ácido cítrico.

(d) O objetivo do experimento consiste em determinar que genes são iniciados *in vivo*. O inibidor de iniciação é acrescentado para impedir a iniciação em sítios de início que podem ter sido ativados durante o isolamento dos núcleos.

24. O DNA é a única fita que forma o tronco da árvore. As fitas de tamanho crescentes são moléculas de RNA; o início da transcrição é onde as cadeias em crescimento são menores; o final da transcrição é onde o crescimento das cadeias termina. O sentido é da esquerda para a direita. Muitas enzimas estão transcrevendo ativamente cada gene.

Capítulo 30

1. O *Oxford English Dictionary* define a tradução como a ação ou o processo de passar de um idioma para outro. A síntese de proteínas converte a informação das sequências de ácidos nucleicos em informação de sequências de aminoácidos.

2. Uma frequência de erros de 1 aminoácido incorreto a cada 10^4 incorporações possibilita a síntese rápida e acurada de proteínas de até 1.000 aminoácidos. Frequências mais altas de erros resultariam em um número demasiado de proteínas defeituosas. Frequências de erros mais baixas provavelmente reduziriam a velocidade de síntese de proteínas, sem ganho significativo na acurácia.

3. (i) Cada uma delas é uma cadeia simples. (ii) Contêm bases incomuns. (iii) Aproximadamente metade das bases está emparelhada para formar duplas-hélices. (iv) A extremidade 5' é fosforilada e é habitualmente pG. (v) O aminoácido liga-se ao grupo hidroxila do resíduo A da sequência CCA na extremidade 3' do tRNA. (vi) O anticódon localiza-se em uma alça próxima ao centro da sequência do tRNA. (vii) As moléculas apresentam uma forma em L.

4. A primeira consiste na formação de aminoacil adenilato, que, em seguida, reage com o tRNA para formar aminoacil-tRNA. Ambas as etapas são catalisadas pela aminoacil-tRNA sintetase.

5. São necessárias características exclusivas, de modo que as aminoacil-tRNA sintetases possam distinguir os tRNA e ligar o aminoácido correto ao tRNA apropriado. São também necessárias características comuns, visto que todo os tRNA precisam interagir com o mesmo mecanismo de síntese de proteínas.

6. Um aminoácido ativado é um aminoácido ligado ao tRNA apropriado.

7. (a) Não; (b) não; (c) sim.

8. O ATP é clivado a AMP e PP_i. Em consequência, é necessário um segundo ATP para converter o AMP em ADP, o substrato para a fosforilação oxidativa.

9. Os aminoácidos maiores do que o aminoácido correto não conseguem se ajustar no sítio ativo do tRNA. Os aminoácidos menores, porém incorretos, que se ligam ao tRNA, encaixam-se no sítio de edição e são clivados do tRNA.

10. Podem ser necessários sítios de reconhecimento em ambas as faces dos tRNA para identificar exclusivamente os 20 tRNA diferentes.

11. As primeiras duas bases em um códon formam pares de bases de Watson-Crick, cuja fidelidade é verificada por bases do rRNA 16S. A terceira base não é inspecionada quanto à sua acurácia, de modo que alguma variação é tolerada.

12. Quatro bandas: leve, pesado, um híbrido de 30S leve e 50S pesado, e um híbrido de 30S pesado e 50S leve.

13. Duzentas moléculas de ATP são convertidas em 200 AMP + 400 P_i para ativar os 200 aminoácidos, o que é equivalente a 400 moléculas de ATP. Uma molécula de GTP é necessária para a iniciação, e são necessárias 398 moléculas de GTP para formar 199 ligações peptídicas.

14. (a, d e e) Tipo 2; (b, c e f) tipo 1.

15. A fase de leitura é um conjunto de códons de três nucleotídios contíguos e não superpostos, que começa com um códon de iniciação e termina com um códon de terminação.

16. Uma mutação causada pela inserção de uma base extra pode ser suprimida por um tRNA contendo uma quarta base em seu anticódon. Por exemplo, UUUC em lugar de UUU é lido como o códon para a fenilalanina por um tRNA contendo 3' -AAAG-5' como anticódon.

17. Uma abordagem consiste em sintetizar um tRNA que seja acilado com um análogo reativo de aminoácido. Por exemplo, o bromoacetil-fenilalanil-tRNA é um reagente de marcação de afinidade para o sítio P dos ribossomos de *E. coli*.

18. A sequência GAGGU é complementar a uma sequência de cinco bases na extremidade 3' do rRNA 16S e está localizada a várias bases a montante de um códon de iniciação AUG. Por conseguinte, essa região é um sinal de iniciação para a síntese de proteínas. Seria esperado que a substituição de G por A fosse enfraquecer a interação desse mRNA com o rRNA 16S, diminuindo, assim, a sua eficiência como sinal de iniciação. De fato, essa mutação resulta em uma diminuição de 10 vezes na velocidade da síntese da proteína especificada por esse mRNA.

19. O peptídio seria Phe-Cys-His-Val-Ala-Ala. Os códons UGC e UGU codificam a cisteína; todavia, como a cisteína foi modificada em alanina, esta última é incorporada no lugar da cisteína.

20. As proteínas são sintetizadas da extremidade aminoterminal para a extremidade carboxiterminal nos ribossomos, enquanto são sintetizadas no sentido reverso do método de fase sólida. O intermediário ativado na síntese ribossômica é um aminoacil-tRNA; no método de fase sólida, é o produto de adição do aminoácido e diciclo-hexilcarbodiimida.

21. As taxas de erro na síntese de DNA, RNA e proteínas, são, respectivamente, da ordem de 10^{-10}, 10^{-5} e 10^{-4} por nucleotídio (ou aminoácido) incorporado. A fidelidade de todos os três processos depende da precisão do pareamento de bases com o molde de DNA ou

de mRNA. Poucos erros são corrigidos na síntese de RNA. Em contrapartida, a fidelidade da síntese de DNA é acentuadamente aumentada pela atividade de revisão 3' → 5' da nuclease e pelo reparo após a replicação. Na síntese de proteínas, o carregamento incorreto de alguns tRNA é corrigido pela ação hidrolítica da aminoacil-tRNA sintetase. A revisão também ocorre quando o aminoacil-tRNA ocupa o sítio A no ribossomo; a atividade de GTPase do EF-Tu estabelece o passo para esse estágio final de edição.

22. O GTP não é hidrolisado até que o aminoacil-tRNA seja levado até o sítio A do ribossomo. Uma hidrólise mais precoce do GTP seria um desperdício, visto que EF-Tu-GDP tem pouca afinidade pelo aminoacil-tRNA.

23. A tradução de uma molécula de mRNA pode ser bloqueada pelo RNA antissentido, uma molécula de RNA com a sequência complementar. O dúplex de RNA antissenso-com RNA senso não pode servir como molde para a tradução; é necessário um mRNA de fita simples. Além disso, o dúplex antissenso-senso é degradado por nucleases. O RNA antissenso adicionado ao meio externo é captado espontaneamente por muitas células. Uma quantidade precisa pode ser administrada por microinjeção. De modo alternativo, um plasmídio que codifica o RNA antissenso pode ser introduzido nas células-alvo.

24. (a) A_5. (b) $A_5 > A_4 > A_3 > A_2$. (c) A síntese é da extremidade aminoterminal para a carboxiterminal.

25. Essas enzimas convertem a informação do ácido nucleico em informação de proteína, interpretando o tRNA e ligando-o ao aminoácido apropriado.

26. A taxa cairia, visto que a etapa de alongamento exige a hidrólise do GTP antes que possa ocorrer qualquer alongamento adicional.

27. Os fatores proteicos modulam a iniciação da síntese de proteínas. O papel do IF1 e do IF3 consiste em impedir a ligação prematura das subunidades ribossômicas 30S e 50S, enquanto o IF2 leva o Met-$tRNA_f$ até o ribossomo. Os fatores proteicos também são necessários para o alongamento (EF-G e EF-Tu), para a terminação (fatores de liberação, RF) e para a dissociação do ribossomo (fatores de liberação do ribossomo, RRF).

28. A sequência de sinal, a partícula de reconhecimento de sinal (SRP), o receptor SRP e o *translocon*.

29. A formação de ligações peptídicas, que, por sua vez, são acionadas pela hidrólise dos aminoacil-tRNA.

30. A sequência de Shine-Dalgarno dos pares de bases do mRNA com parte do rRNA 16S e da subunidade 30S, que posiciona a subunidade de modo que o iniciador AUG seja reconhecido.

31.

	Procarioto	**Eucarioto**
Tamanho do ribossomo	60S	80S
mRNA	Policistrônico	Não policistrônico
Iniciação	É necessária a sequência de Shine-Dalgarno	Utiliza o primeiro AUG
Fatores proteicos	Necessários	Necessários muitos mais
Relação com a transcrição	A tradução pode começar antes do término da transcrição	A transcrição e a tradução são espacialmente separadas
Primeiro aminoácido	fMET	Met

32. A SRP liga-se à sequência sinal e inibe a tradução subsequente. A SRP conduz o ribossomo inibido ao RE, onde interage com o receptor de SRP (SR). O complexo SRP-SR liga-se ao *translocon* e, simultaneamente, hidrolisa o GTP. Com a hidrólise do GTP, a SRP e o SR dissociam-se um do outro e do ribossomo. A síntese de proteínas recomeça, e a proteína nascente é canalizada através do *translocon*.

33. A alternativa seria um único ribossomo traduzindo uma única molécula de mRNA. O uso de polissomos possibilita uma maior síntese de proteína por molécula de mRNA por determinado período de tempo e, portanto, a produção de mais proteína.

34. (a) 1, 2, 3, 5, 6,10; (b) 1, 2, 7, 8; (c) 1, 4, 8, 9.

35. Os RNA transportadores desempenham papéis em vários processos de reconhecimento. Um tRNA precisa ser reconhecido pela aminoacil-tRNA sintetase apropriada, e o tRNA precisa interagir com o ribossomo e, em particular, com a peptidil transferase.

36. O nucleófilo é o grupo amino do aminoacil-tRNA. Esse grupo amino ataca o grupo carbonila do éster de peptidil-tRNA para formar

um intermediário tetraédrico, que elimina o tRNA na forma de álcool para formar uma nova ligação peptídica.

37. O aminoacil-tRNA pode ser inicialmente sintetizado. Todavia, o grupo amino da cadeia lateral ataca a ligação éster, formando uma amida de seis membros, com liberação do tRNA.

38. O EF-Ts catalisa a troca de GTP pela GDP ligado ao EF-Tu. Nas cascatas de proteína G, um receptor 7TM ativado catalisa a troca de GTP-GDP em uma proteína G.

39. As subunidade α das proteínas G são inibidas por um mecanismo semelhante no cólera e na coqueluche (Seção 14.5).

40. O Glu-tRNA^{Gln} é formado por acilação incorreta. O glutamato ativado sofre amidação subsequente para formar Gln-tRNA^{Gln}. Os modos pelos quais a glutamina é formada a partir do glutamato foram discutidos na Seção 24.2. No que concerne ao *H. pilori,* uma enzima específica, a Glu-tRNA^{Gln}, amidotransferase, catalisa a seguinte reação:

$$Gln + Glu\text{-}tRNA^{Gln} + ATP \rightarrow$$

$$Gln\text{-}tRNA^{Gln} + glu + ADP + P_i$$

O Glu-tRNA^{Glu} não é um substrato para a enzima; por conseguinte, a transferase também precisa reconhecer aspectos da estrutura do tRNA^{Gln}.

41. A estrutura primária determina a estrutura tridimensional da proteína. Por conseguinte, a fase final de transferência de informação do DNA para o RNA e para a síntese de proteínas consiste no enovelamento da proteína em seu estado funcional.

42. (a) O eIF-4H tem dois efeitos: (1) o grau de desenrolamento é aumentado e (2) a velocidade de desenrolamento é aumentada, conforme indicado pela acentuada elevação de atividade nos tempos iniciais de reação. (b) Para estabelecer firmemente que o efeito de eIF-H4 não foi devido a qualquer atividade inerente de helicase. (c) A metade da atividade máxima foi obtida com 0,11 mM de eIF-4H. Por conseguinte, o estímulo máximo seria obtido em uma razão de 1:1. (d) O eIF-4H aumenta a taxa de desenrolamento de todas as hélices, porém o efeito é maior à medida que as hélices aumentam de estabilidade. (e) Os resultados no gráfico C sugerem que o eIF-4H aumente a processividade.

43. (a) Os três picos representam, da esquerda para a direita, a subunidade ribossômica 40S, a subunidade ribossômica 60S e o ribossomo 80S. (b) Não apenas as subunidades ribossômicas e o ribossomo 80S presentes, mas também os polissomos de vários comprimentos também são aparentes. Os picos individuais na região do polissomo representam polissomos de comprimentos distintos. (c) O tratamento inibiu significativamente o número de polissomos, enquanto aumentou o número de subunidades ribossômicas livres. Esse resultado pode ser devido à inibição da iniciação da síntese de proteínas ou da transcrição.

Capítulo 31

1. (a) As células expressarão β-galactosidase, *lac* permease e tiogalactosídeo transacetilase, mesmo na ausência de lactose. (b) As células expressarão β-galactosidase, *lac* permease e tiogalactosídeo transacetilase, mesmo na ausência de lactose. (c) Os níveis de enzimas catabólicas, como, por exemplo, β-galactosidase e arabinose isomerase, permanecerão baixos mesmo quando os níveis de glicose estiverem baixos.

2. A concentração é $1/(6 \times 10^{23})$ moles por 10^{-15} $l = 1{,}7 \times 10^{-9}$ M. Visto que $K_d = 10^{-13}$ M, a única molécula deve estar ligada a seu sítio de ligação específico.

3. O número de possíveis sítios com 8 pb é $4^8 = 65.536$. Em um genoma de $4{,}6 \times 10^6$ pares de bases, o sítio médio deve aparecer $(4{,}6 \times 10^6)/65.536 = 70$ vezes. Cada sítio com 10 pb deve aparecer quatro vezes. Cada sítio com 12 pb deve aparecer 0,27 vez (muitos sítios com 12 pb não aparecerão).

4. O repressor *lac* não se liga ao DNA quando o repressor está ligado a uma molécula pequena (o indutor), enquanto o repressor *pur* liga-se ao DNA apenas quando o repressor está ligado a uma molécula pequena (o correpressor). O genoma de *E. coli* contém apenas uma região de ligação para o repressor *lac,* mas tem muitos locais de ligação para o repressor *pur.*

5. Anti-indutores ligam-se à conformação de repressores, tais como do repressor *lac,* que conseguem se ligar ao DNA. Eles ocupam um sítio que se superpõe ao do indutor e, portanto, competem pela ligação com o repressor.

6. A repetição invertida pode ser um sítio de ligação para uma proteína dimérica de ligação ao DNA ou pode corresponder a uma estrutura de haste-alça no RNA codificado.

7. É mais provável que o bacteriófago λ entre na fase lítica porque a ligação cooperativa do repressor λ com O_R2 e O_R1, que apoia a via lisogênica, seria comprometida.

8. repressor λ Região –10 GATTTA Região –35 TAGATA

Gene cRO Região –10 TAATGG Região –35 TTGACT

Existem quatro diferenças na região –10 e três diferenças na região –35.

9. A concentração aumentada de Cro reduz a expressão do gene do repressor λ. A concentração aumentada de repressor λ reduz a expressão do gene Cro. Em concentrações baixas de repressor λ, a concentração aumentada de repressor λ aumenta a expressão do gene do repressor λ. Em concentrações mais elevadas de repressor λ, a concentração aumentada de repressor λ reduz a expressão do gene do repressor λ.

10. Normalmente, os mRNA bacterianos apresentam uma sequência líder na qual a sequência de Shine-Delgarno precede o códon inicializador AUG. A ausência de uma sequência líder deveria resultar em tradução ineficiente.

11. Acrescente cada composto a uma cultura de *V. fischeri* em baixa densidade e veja se aparece luminescência.

12. ACC, 7; ACA, 1; ACU, 0; ACG, 0.

13. A reação ocorre em associação à conservação global da configuração. Cada etapa provavelmente ocorre com inversão da configuração, sugerindo que a reação consiste em duas etapas (ou algum outro número par de etapas). Um mecanismo possível é o ataque nucleofílico pelo grupo carboxilato de Glu 537 ao átomo de carbono C-1 da galactose, liberando glicose e formando um intermediário com a galactose conectada a enzima por uma ligação éster. A água ataca esse átomo de carbono, deslocando o carboxilato do glutamato e liberando galactose.

14. A ligação parece estar parcialmente completa em uma concentração de repressor λ em torno de 3,7 nM. Assim sendo, K_d é aproximadamente 3,7 nM e $\Delta G° = –48$ kJ/mol (–11 kcal/mol) a 298 K.

Capítulo 32

1. A distribuição dos aminoácidos com carga elétrica é H2A (13 K, 13 R, 2 D, 7 E, carga elétrica = +17), H2B (20 K, 8 R, 3 D, 7 E, carga elétrica = +18), H3 (13 K, 18 R, 4 D, 7 E, carga elétrica = +20), H4 (11 K, 14 R, 3 D, 4 E, carga elétrica = +18). Estima-se que a carga elétrica total do octâmero de histona seja 2 × (17 + 18 + 20 + 18) = +146. A carga elétrica total de 150 pares de base de DNA é –300. Assim, o octâmero de histona neutraliza aproximadamente metade da carga elétrica.

2. A existência de um fragmento específico de DNA poderia ser detectada por hibridização, por PCR ou por sequenciamento direto.

3. O comprimento total estimado do DNA é 145 pb × 3,4 Å/pb = 493 Å, que representa 1,75 volta ou 1,75 × 2 πr = 11,0 r. Portanto, o raio estimado é r = 493 Å/11,0 = 44,8 Å.

4. 5-Azacitidina não pode ser metilada. Alguns genes, normalmente reprimidos por metilação, estarão ativos.

5. As proteínas que contêm esses domínios serão alvo para o DNA metilado em regiões promotoras reprimidas. Provavelmente serão conectadas no sulco maior onde está localizado o grupo metila.

6. Não se espera que a expressão gênica responda ao estrógeno Todavia, genes cuja expressão normalmente responde ao estrógeno responderão à progesterona.

7. A acetilação da lisina reduzirá a carga elétrica de +1 para 0. A metilação da lisina não reduzirá a carga elétrica.

8. Com base no padrão dos resíduos de cisteína e histidina, essa região parece conter três domínios *zinc-finger* (dedos de zinco).

9. 10/4.000 = 0,25%. 0,25% de 12 Mb = 30 quilopares de bases.

10. O acréscimo do IRE à extremidade 5' do mRNA muito provavelmente bloqueia a tradução na ausência de ferro. Não se espera que o acréscimo do IRE à extremidade 3' do mRNA bloqueie a tradução, mas poderia influenciar a estabilidade do mRNA.

11. As sequências de todos os mRNA seriam analisadas à procura de sequências totalmente complementares ou quase complementares à sequência do miRNA. Essas sequências seriam candidatas à regulação por esse mRNA.

12. O grupo amino do resíduo de lisina, formado a partir da forma protonada por uma base, ataca o grupo carbonila da acetil-CoA para gerar um intermediário tetra-hedral. Esse intermediário colapsa para formar a ligação amida e liberar CoA.

13. Em DNA de camundongo, a maioria dos sítios para *Hpa*II é metilada e, portanto, não é clivada pela enzima, resultando em grandes fragmentos, Alguns fragmentos pequenos são produzidos a partir de ilhotas CpG que não são metiladas. No caso de DNA de *Drosophila* e *E. coli,* não ocorre metilação e todos os sítios são clivados.

Capítulo 33

1. O nematódeo transgênico deve evitar o composto. A identidade do ligante é determinada pelo receptor, enquanto a resposta comportamental é determinada pelo neurônio no qual se expressa o receptor.

2. Apenas uma mistura dos compostos C_5-COOH e HOOC-C_7-COOH irá previsivelmente produzir esse padrão.

3. As sensações de amargo e doce são mediadas por proteínas G acopladas aos receptores 7TM, levando a um tempo de resolução de

milissegundos. As sensações de salgado e azedo são mediadas diretamente por canais iônicos, que podem ter um tempo de resolução mais rápido.

4. O som percorre 0,15 m em 428 μs. O sistema auditivo humano é capaz de perceber diferenças de tempo próximas a 1 μs, de modo que a diferença nos tempos de chegada às duas orelhas é substancial. É pouco provável que um sistema com base em proteína G seja capaz de distinguir de modo confiável os sinais que chegam às duas orelhas, visto que a s proteínas G tipicamente respondem em milissegundos.

5. Se uma planta tiver sabor amargo, os animais evitarão comê-la, mesmo se ela não for tóxica, o que pode representar uma vantagem seletiva para a planta.

6. Utilizando camundongos nos quais o gene para T1R1 ou o gene T1R3 foi destruído, testar as respostas do paladar desses animais ao glutamato, ao aspartato e a uma ampla variedade de outros aminoácidos.

7. Essas mulheres apresentam quatro receptores funcionais para cor: azul, vermelho, verde e um híbrido vermelho-verde. O receptor adicional possibilita a diferenciação de algumas cores que parecem idênticas para a maioria das pessoas.

8. 380 (um para cada receptor); (380 × 379)/2! = 72.010 combinações de dois receptores; (380 × 379 × 378)/3! = 9.073.260 combinações de três receptores.

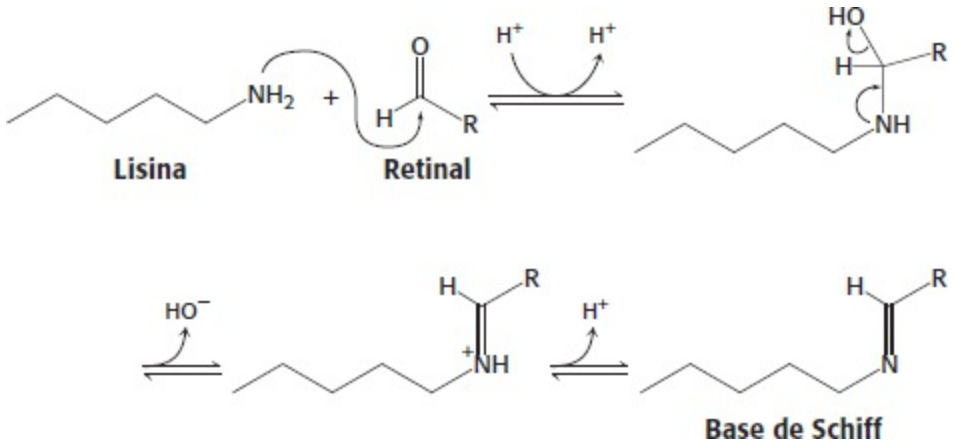
9. A absorção de luz converte 11-cis-retinal em all-trans-retinal.

10. Esses compostos são enantiômeros e têm de se ligar a receptores de proteína para incitar um odor. Até mesmo diferenças estruturais sutis podem influenciar as afinidades relativas de ligação dos receptores e, assim, o odor incitado.

11. Visão: canal regulado por cGMP; paladar: canal de sódio sensível a amilorida; audição: canal *tip-link*.

12. Para todos os sentidos, a hidrólise de ATP é necessária para gerar e manter gradientes iônicos e o potencial de membrana. Olfato: ATP é necessário para a síntese de cAMP. Paladar: ATP é necessário para a síntese de nucleotídios cíclicos e GTP é necessário para a ação da gustoducina na detecção de sabores doces e amargos. Visão: GTP é necessário para a síntese de cGMP e para a ação da transducina. Audição e tato: a hidrólise de ATP é necessária para gerar e manter gradientes iônicos e potencial de membrana e também pode desempenhar outras funções.

13.



Capítulo 34

1. O sistema imune inato responde rapidamente a características comuns presentes em muitos patógenos. Os genes para as moléculas essenciais do sistema imune inato são expressos sem modificação substancial. Em contrapartida, o sistema imune adaptativo responde a características específicas que só estão presentes em determinado patógeno. Seus genes sofrem rearranjo e mutação significativos para possibilitar o reconhecimento específico de uma enorme quantidade de superfícies potenciais de ligação.

2. Recombinação VJ e V(D)J; variabilidade na junção de segmentos pela ação da desoxirribonucleotidil transferase terminal; mutação somática.

3. A *afinidade* refere-se à força de uma única interação; a avidez refere-se à força cumulativa de múltiplas interações independentes de ligação. A *avidez* pode desempenhar um papel significativo na interação entre a IgM e o antígeno, visto que essa classe de imunoglobulina apresenta 10 sítios de ligação.

4. O domínio de sinalização intracelular comum a cada um dos TLR é responsável pela atracagem de outras proteínas e pela propagação da informação de que foi detectado um padrão molecular associado a patógeno (PAMP), como o LPS. Se uma mutação dentro desse domínio interferir na atracagem intracelular e na transdução de sinais, o TLR-4 não irá responder ao LPS.

5. Os vírus que contêm genomas de RNAds devem estimular uma resposta imune mediada por TLR-3.

6. (a) $\Delta G^{\circ\prime} = -37$ kJ mol^{-1} ($-8{,}9$ kcal mol^{-1})

(b) $K_a = 3{,}3 \times 10^6$ M^{-1}

(c) $k_{on} = 4 \times 10^8$ M^{-1} s^{-1}. Esse valor está próximo do limite controlado por difusão para a combinação de uma molécula pequena com uma proteína (ver p. 247). Por conseguinte, o grau de mudança estrutural é provavelmente pequeno; as transições de conformação extensas levam tempo.

7. O aumento da fluorescência e a mudança para a cor azul indicam que a água é, em grande parte, excluída do sítio de combinação quando o hapteno está ligado. As interações hidrofóbicas contribuem significativamente para a formação da maioria dos complexos antígeno-anticorpo.

8. (a) Um sítio de combinação de anticorpo é formado pelas CDR de ambas as cadeias H e L. Os domínios V_H e V_L são essenciais. Uma pequena proporção de fragmentos F_{ab} pode ser subsequente-mente digerida, produzindo F_v, um fragmento que contém apenas esses dois domínios. C_H1 e C_L contribuem para a estabilidade do F_{ab}, mas não para a ligação do antígeno.

(b) Foi preparado um análogo sintético de F_v de 248 resíduos pela expressão de um gene sintético constituído de um gene V_H unido a um gene V_L através de um ligante. Ver J. S. Huston *et al., Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:5879-5883, 1988.

9. (a) Os antígenos multivalentes levam à dimerização ou oligomerização de imunoglobulinas transmembranares, uma etapa essencial na sua ativação. Esse modo de ativação lembra o dos receptores de tirosina quinases (Seção 14.2).

(b) Um anticorpo específico para uma imunoglobulina transmembranar ativará uma célula B por ligação cruzada desses receptores. Esse experimento pode ser realizado utilizando, por exemplo, um anticorpo de cabra para a ligação cruzada de receptores em uma célula B de camundongo.

10. As células B não expressam receptores de células T. A hibridização dos cDNA das células T com mRNA das células B remove os cDNA que estão expressos em ambas as células. Por conseguinte, a mistura de cDNA subsequentemente a essa hibridização é enriquecida naquelas que codificam receptores de células T. Esse procedimento, denominado hibridização subtrativa, é geralmente útil para isolar cDNA presentes em pouca quantidade. A hibridização deve ser efetuada com o uso de mRNA de uma célula estreitamente relacionada que não expresse o gene de interesse. Ver em S. M. Hedrick, M. M. Davis, D. I. Cohen, E. A. Nielsen e M. M. Davis, *Nature* 308:149-153, 1984, um relato interessante sobre o modo pelo qual esse método foi usado para obter genes para receptores de células T.

11. O TLR-4 é o receptor de LPS, uma toxina encontrada especificamente nas paredes das bactérias gram-negativas. As mutações que inibem a função do TLR4 comprometem as defesas de um indivíduo afetado contra essa classe de bactérias.

12. Se os alelos HLA não forem tipados, os receptores de células T do receptor irão identificar as proteínas do MHC do tecido transplantado como não próprias, e haverá probabilidade de rejeição do transplante.

13. Purifique um anticorpo com uma especificidade para determinado antígeno. Desnature o anticorpo e deixe que ele sofra novo enovelamento na presença ou na ausência do antígeno. Teste os anticorpos novamente enovelados quanto à sua capacidade de ligação de antígenos.

14. Em alguns casos, o rearranjo V-D-J resultará na combinação dos segmentos V, D e J fora de fase. As moléculas de mRNA produzidas por esses genes que sofreram rearranjo produzirão moléculas truncadas se forem traduzidas. Essa possibilidade é excluída pela degradação do mRNA.

15. As bactérias mutantes ainda são capazes de estimular uma resposta imune, porém sem causar doença. Por conseguinte, podem constituir pontos iniciais valiosos para o planejamento de uma vacina viva atenuada contra a cepa patogênica original.

16. O peptídio é LLQATYSAV (L na segunda posição e V na última).

17. A catálise provavelmente necessitará de uma base para remover um próton de uma molécula de água. É mais provável um resíduo de histidina, glutamato ou aspartato. Além disso, um doador de ponte de hidrogênio potencial pode estar presente e irá interagir com o átomo de oxigênio de carga negativa que surge no estado de transição.

18. Um resíduo de fosfotirosina na extremidade carboxiterminal de Src e proteína tirosina quinases relacionadas liga-se a seu próprio domínio SH2, produzindo a forma inibida de Src (Seção 14.5). A remoção do grupo fosforila desse resíduo ativará a quinase.

19. (a) $K_d = 10^{-7}$ M; (b) $K_d = 10^{-9}$ M. O gene provavelmente foi gerado por uma mutação pontual no gene para o anticorpo A, e não por um rearranjo *de novo*.

Capítulo 35

1. (a) O músculo esquelético e os cílios dos eucariotos obtêm a sua energia livre da hidrólise do ATP; o motor flagelar bacteriano usa

uma força próton-motriz.

(b) O músculo esquelético necessita de miosina e actina. Os cílios dos eucarióticos precisam de microtúbulos e dineína. O motor flagelar bacteriano requer MotA, MotB e FliG, bem como muitos componentes auxiliares.

2. 6.400 Å/80 Å = 80 comprimentos corporais por segundo. Para um automóvel de 3 m de comprimento, essa velocidade em comprimentos corporais corresponde a uma velocidade de 80 × 3 m = 240 m por segundo ou 545 milhas por hora.

3. 4 pN = $8{,}8 \times 10^{-13}$ libras. O peso de um único domínio motor é de 100.000 g mol^{-1} ($6{,}023 \times 10^{23}$ moléculas mol^{-1}) = $1{,}7 \times 10^{-19}$ g = $3{,}7 \times 10^{-22}$ libras. Por conseguinte, um domínio motor pode levantar ($8{,}8 \times 10^{-13}/3{,}7 \times 10^{-22}$) = $2{,}4 \times 10^{9}$ vezes o seu peso.

4. Tanto os filamentos de actina quanto os microtúbulos são constituídos de subunidades, e essas subunidades ligam-se a nucleosídios trifosfatos e os hidrolisam. Os filamentos de actina são constituídos de um único tipo de subunidade, e essas subunidades ligam-se ao ATP. Os microtúbulos são compostos de dois tipos diferentes de subunidades, e essas subunidades ligam-se ao GTP.

5. As cadeias leves de miosina enrijecem o braço de alavanca. As cadeias leves na cinesina ligam-se à carga a ser transportada.

6. Após a morte, a razão entre ADP e ATP aumenta rapidamente. O domínio motor da miosina na forma com ADP liga-se firmemente à actina. Interações de miosina-actina são possíveis, visto que a queda na concentração de ATP também possibilita a elevação da concentração de cálcio, eliminando o bloqueio da actina pela tropomiosina por meio da ação do complexo de troponina.

7. Acima de sua concentração crítica, ocorre polimerização de ATP-actina. Com o tempo, o ATP sofre hidrólise, formando ADP-actina, que apresenta uma concentração crítica maior. Por conseguinte, se a concentração inicial de subunidades estiver entre as concentrações críticas de ATP-actina e ADP-actina, os filamentos irão se formar inicialmente e, a seguir, irão desaparecer com a hidrólise do ATP.

8. Um passo com distância de uma base tem aproximadamente 3,4 Å = $3{,}4 \times 10^{-4}$ μm. Se for suposta uma estequiometria de uma molécula de ATP por passo, essa distância corresponderá a uma velocidade de 0,017 μm s^{-1}. A cinesina move-se em uma velocidade de 6.400 Å por segundo ou 0,64 μm s^{-1}.

9. Uma força próton-motriz através da membrana plasmática é necessária para impulsionar o motor flagelar. Em condições de inanição, ocorre depleção dessa força próton-motriz. Em solução ácida, a diferença de pH através da membrana é suficiente para acionar o motor.

10. A distância média entre rodopios seria maior se a bactéria estivesse se movendo ao longo de um gradiente de um quimioatraente.

11. (a) $1{,}13 \times 10^{-9}$ dina

(b) $6{,}8 \times 10^{14}$ erg

(c) $6{,}6 \times 10^{-11}$ erg por 80 moléculas de ATP. Um único motor de cinesina fornece mais do que energia livre suficiente para acionar o transporte de cargas do tamanho de micrômetros em velocidades de micrômetros por segundo.

12. A distância entre subunidades idênticas nos microtúbulos é de 8 nm. Por conseguinte, uma molécula de cinesina com um comprimento de passo que não seja múltiplo de 8 nm teria que ser capaz de se ligar a mais de um tipo de sítio na superfície do microtúbulo.

13. A KIF1A precisa estar fixada a um elemento adicional de ligação de microtúbulo que conserve uma ligação ao microtúbulo quando o domínio motor se libera.

14. Os filamentos formados a partir de subunidades podem ser arbitrariamente longos, podem sofrer montagem e desmontagem dinamicamente e só necessitam de uma pequena quantidade de informação genética para a sua codificação.

15. Os prótons ainda fluem do lado externo para dentro da célula. Cada próton poderia passar pelo meio-canal externo de um complexo MotA-MotB, ligar-se ao anel MS, rotar em sentido horário e seguir para o meio-canal interno do complexo MotA-MotB adjacente.

16. Na presença de concentração elevada de íons cálcio, o Ca^{2+} ligase à calmodulina. Por sua vez, a calmodulina liga-se a uma proteína quinase que fosforila as cadeias leves de miosina e as ativa. Em baixas concentrações de íons cálcio, as cadeias leves são desfosforiladas por uma fosfatase independente de Ca^{2+}.

17. (a) O valor de k_{cat} é de aproximadamente 13 moléculas por segundo, enquanto o valor de K_m para o ATP é de cerca de 12 μM.

(b) O comprimento do passo é de aproximadamente (380 – 120)/7 = 37 nm.

(c) O comprimento do passo é muito grande, o que é compatível com a presença de seis sítios de ligação de cadeias leves e, portanto, braços de alavanca muito longos. A taxa de liberação de ADP é essencialmente idêntica à k_{cat} global; por conseguinte, a liberação de ADP é limitadora de velocidade, o que sugere que ambos os domínios motores podem ligar-se simultaneamente em sítios separados por uma distância de 37 nm. A liberação de ADP do último domínio possibilita a ligação do ATP, levando à liberação de actina e ao movimento do braço de alavanca.

Capítulo 36

1. (a) Antes; (b) depois; (c) depois; (d) depois; (e) antes; (f) depois.

2. (a) Sim; (b) sim; (c) não (PM > 600).

3. Se os programas computadorizados pudessem estimar os valores de log(*P*) com base na estrutura química, o tempo de laboratório necessário para o desenvolvimento de medicamentos poderia ser encurtado. Não haveria mais a necessidade de determinar as solubilidades relativas dos candidatos farmacêuticos ao deixar cada composto entrar em equilíbrio entre a fase aquosa e uma fase orgânica.

4. Talvez a *N*-acetilcisteína se conjugasse com parte de *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina, que é produzida pelo metabolismo do paracetamol, impedindo, assim, a depleção do suprimento hepático de glutationa.

5. Nos estudos clínicos de fase 1, aproximadamente 10 a 100 voluntários saudáveis, são tipicamente recrutados em um estudo planejado para avaliar a segurança. Em contraste, um número maior de indivíduos é recrutado em um estudo clínico típico de fase 2. Além disso, esses indivíduos podem se beneficiar da administração do fármaco. Em um estudo clínico de fase 2, podem ser avaliadas a eficácia, a dose e a segurança de um medicamento.

6. A ligação de outros medicamentos à albumina poderia causar a liberação adicional de varfarina. (A albumina é um carreador geral de moléculas hidrofóbicas.)

7. Um medicamento capaz de inibir uma enzima do citocromo P450 pode afetar drasticamente a disposição de outro medicamento metabolizado pela mesma enzima. Se esse metabolismo inibido não for considerado na determinação da dose, o segundo medicamento pode alcançar níveis muito elevados e, algumas vezes, tóxicos no sangue.

8. Diferentemente da inibição competitiva, a inibição não competitiva não pode ser superada com a adição de substrato. Por conseguinte, um medicamento que atua por um mecanismo não competitivo não será afetado por uma mudança nos níveis do substrato fisiológico.

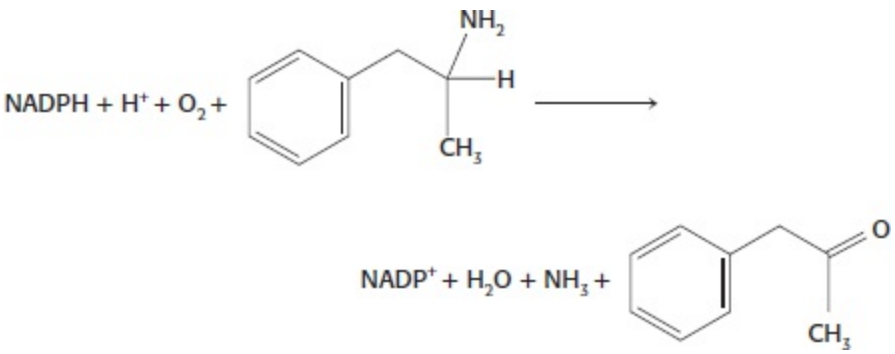
9. Um inibidor da RMF pode impedir o efluxo de um agente quimioterápico das células tumorais. Por conseguinte, esse tipo de inibidor poderia ser útil para impedir o desenvolvimento de resistência à quimioterapia do câncer.

10. Os agentes que inibem uma ou mais enzimas da via glicolítica poderiam atuar sobre os tripanossomos, privando-os de energia. Por conseguinte, seriam úteis para o tratamento da doença do sono. Uma dificuldade é que a glicólise nas células do hospedeiro também seria inibida.

11. O imatinibe é um inibidor da Bcr-Abl quinase, uma quinase mutante encontrada apenas nas células tumorais que sofreram translocação entre os cromossomos 9 e 22 (ver Figura 14.33). Antes do início do tratamento com imatinibe, pode ser efetuado o sequenciamento do DNA das células tumorais para determinar (a) se essa translocação ocorreu e (b) se a sequência de *bcr-abl* apresenta qualquer mutação capaz de tornar a quinase resistente ao imatinibe. Caso não tenha ocorrido translocação, e se o gene apresentar mutações de resistência, é provável que o imatinibe não seja um tratamento efetivo para pacientes portadores desse tumor particular.

12. A sildenafila aumenta os níveis de cGMP ao inibir a degradação mediada pela fosfodiesterase do cGMP a GMP. Os níveis intracelulares de cGMP também podem ser aumentados pela ativação de sua síntese. Essa ativação pode ser obtida com o uso de doadores de NO (como nitroprusseto de sódio e nitroglicerina) ou compostos que ativam a atividade de guanilato ciclase. Fármacos que atuam por este último mecanismo estão atualmente em fase de estudos clínicos.

13. Um mecanismo razoável seria uma desaminação oxidativa seguindo um mecanismo global semelhante ao da Figura 36.9, com liberação de amônia.



14. $K_I \approx 0{,}3$ nM. $IC_{50} \approx 2{,}0$ nM. Sim, o composto A seria efetivo se administrado por via oral, visto que o valor de 400 nM é muito maior do que os valores estimados de K_I e IC_{50}.

Leitura Sugerida

Capítulo 2

Literatura Básica

Service, R. F. 2008. Problem solved*(*sort of) (a brief review of protein folding). *Science* 321:784–786.

Doolittle, R. F. 1985. Proteins. *Sci. Am.* 253(4):88–99.

Richards, F. M. 1991. The protein folding problem. *Sci. Am.* 264(1): 54–57.

Weber, A. L., and Miller, S. L. 1981. Reasons for the occurrence of the twenty coded protein amino acids. *J. Mol. Evol.* 17:273–284.

Livros

Petsko, G. A., and Ringe, D. 2004. *Protein Structure and Function.* New Science Press.

Tanford, C., and Reynolds, J. 2004. *Nature's Robots: A History of Proteins.* Oxford.

Branden, C., and Tooze, J. 1999. *Introduction to Protein Structure* (2d ed.). Garland.

Creighton, T. E. 1992. *Proteins: Structures and Molecular Principles* (2d ed.). W. H. Freeman and Company.

Conformação das Proteínas

Smock, R. G., and Gierasch, L. M. 2009. Sending signals dynamically. *Science* 324:198–203.

Tokuriki, N., and Tawfik, D. S. 2009. Protein dynamism and evolvability. *Science* 324:203–207.

Pace, C. N., Grimsley, G. R., and Scholtz, J. M. 2009. Protein ionizable groups: p*K* values and their contribution to protein stability and solubility. *J. Biol. Chem.* 284:13285–13289.

Ronald Breslow, R., and Cheng, Z.-L. 2009. On the origin of terrestrial homochirality for nucleosides and amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:9144–9146.

Estrutura Secundária

Shoulders, M. D., and Raines, R. T. 2009. Collagen structure and stability. *Annu. Rev. Biochem.* 78:929–58.

O'Neil, K. T., and DeGrado, W. F. 1990. A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. *Science* 250:646–651.

Zhang, C., and Kim, S. H. 2000. The anatomy of protein beta-sheet topology. *J. Mol. Biol.* 299:1075–1089.

Regan, L. 1994. Protein structure: Born to be beta. *Curr. Biol.* 4:656–658.

Srinivasan, R., and Rose, G. D. 1999. A physical basis for protein secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:14258–14263.

Proteínas Intrinsicamente Desestruturadas

Galea, C. A., Wang, Y., Sivakolundu, S. G., and Kriwacki, R. W. 2008. Regulation of cell division by intrinsically unstructured proteins: Intrinsic flexibility, modularity, and signaling conduits. *Biochemistry* 47:7598–7609.

Raychaudhuri, S., Dey, S., Bhattacharyya, N. P., and Mukhopadhyay, D. 2009. The role of intrinsically unstructured proteins in neurodegenerative diseases. *PLoS One* 4:e5566.

Tompa, P., and Fuxreiter, M. 2008. Fuzzy complexes: Polymorphism and structural disorder in protein–protein interactions. *Trends Biochem. Sci.* 33:2–8.

Tuinstra, R. L., Peterson, F. C., Kutlesa, E. S., Elgin, S., Kron, M. A., and Volkman, B. F. 2008. Interconversion between two unrelated protein folds in the lymphotactin native state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:5057–5062.

Domínios

Jin, J., Xie, X., Chen, C., Park, J. G., Stark, C., James, D. A., Olhovsky, M., Linding, R., Mao, Y., and Pawson, T. 2009. Eukaryotic protein domains as functional units of cellular evolution. *Sci. Signal.* 2:ra76.

Bennett, M. J., Choe, S., and Eisenberg, D. 1994. Domain swapping: Entangling alliances between proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:3127–3131.

Bergdoll, M., Eltis, L. D., Cameron, A. D., Dumas, P., and Bolin, J. T. 1998. All in the family: Structural and evolutionary relationships among three modular proteins with diverse functions and variable assembly. *Protein Sci.* 7:1661–1670.

Hopfner, K. P., Kopetzki, E., Kresse, G. B., Bode, W., Huber, R., and Engh, R. A. 1998. New enzyme lineages by subdomain shuffling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:9813–9818.

Ponting, C. P., Schultz, J., Copley, R. R., Andrade, M. A., and Bork, P. 2000. Evolution of domain families. *Adv. Protein Chem.* 54:185–244.

Enovelamento das Proteínas

Caughey, B., Baron, G. S., Chesebro, B., and Jeffrey, M. 2009. Getting a grip on prions: Oligomers, amyloids, and pathological membrane interactions. *Annu. Rev. Biochem.* 78:177–204.
Cobb, N. J., and Surewicz, W. K. 2009. Prion diseases and their biochemical mechanisms. *Biochemistry* 48:2574–2585.
Daggett, V., and Fersht, A. R. 2003. Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends Biochem. Sci.* 28:18–25.
Selkoe, D. J. 2003. Folding proteins in fatal ways. *Nature* 426:900–904.
Anfinsen, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181:223–230.
Baldwin, R. L., and Rose, G. D. 1999. Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding. *Trends Biochem. Sci.* 24:26–33.
Baldwin, R. L., and Rose, G. D. 1999. Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states. *Trends Biochem. Sci.* 24:77–83.
Kuhlman, B., Dantas, G., Ireton, G. C., Varani, G., Stoddard, B. L., and Baker, D. 2003. Design of a novel globular protein with atomic-level accuracy. *Science* 302:1364–1368.
Staley, J. P., and Kim, P. S. 1990. Role of a subdomain in the folding of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Nature* 344:685–688.

Modificação Covalente das Proteínas

Tarrant, M. K., and Cole, P. A. 2009. The chemical biology of protein phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 78:797–825.
Krishna, R. G., and Wold, F. 1993. Post-translational modification of proteins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 67:265–298.
Aletta, J. M., Cimato, T. R., and Ettinger, M. J. 1998. Protein methylation: A signal event in post-translational modification. *Trends Biochem. Sci.* 23:89–91.
Tsien, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67:509–544.

Capítulo 3

Literatura Básica

Sanger, F. 1988. Sequences, sequences, sequences. *Annu. Rev. Biochem.* 57:1–28.
Merrifield, B. 1986. Solid phase synthesis. *Science* 232:341–347.
Hunkapiller, M. W., and Hood, L. E. 1983. Protein sequence analysis: Automated microsequencing. *Science* 219:650–659.
Milstein, C. 1980. Monoclonal antibodies. *Sci. Am.* 243(4):66–74.
Moore, S., and Stein, W. H. 1973. Chemical structures of pancreatic ribonuclease and deoxyribonuclease. *Science* 180:458–464.

Livros

Methods in Enzymology. Academic Press.
Wilson, K., and Walker, J. (Eds.). 2000. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry* (5th ed.). Cambridge University Press.
Van Holde, K. E., Johnson, W. C., and Ho, P.-S. 1998. *Principles of Physical Biochemistry.* Prentice Hall.
Wilkins, M. R., Williams, K. L., Appel, R. D., and Hochstrasser, D. F. 1997. *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics (Principles and Practice).* Springer Verlag.
Johnstone, R. A. W. 1996. *Mass Spectroscopy for Chemists and Biochemists* (2d ed.). Cambridge University Press.
Kyte, J. 1994. *Structure in Protein Chemistry.* Garland.
Creighton, T. E. 1993. *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2d ed.). W. H. Freeman and Company.
Cantor, C. R., and Schimmel, P. R. 1980. *Biophysical Chemistry.* W. H. Freeman and Company.

Purificação e Análise de Proteína

Blackstock, W. P., and Weir, M. P. 1999. Proteomics: Quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 17:121–127.
Deutscher, M. (Ed.). 1997. *Guide to Protein Purification.* Academic Press.
Dunn, M. J. 1997. Quantitative two-dimensional gel electrophoresis: From proteins to proteomes. *Biochem. Soc. Trans.* 25:248–254.
Scopes, R. K., and Cantor, C. 1994. *Protein Purification: Principles and Practice* (3d ed.). Springer Verlag.
Aebersold, R., Pipes, G. D., Wettenhall, R. E., Nika, H., and Hood, L. E. 1990. Covalent attachment of peptides for high sensitivity solid-phase sequence analysis. *Anal. Biochem.* 187:56–65.

Ultracentrifugação e Espectrometria de Massa

Steen, H., and Mann, M. 2004. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:699–711.
Glish, G. L., and Vachet, R. W. 2003. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2:140–150.
Li, L., Garden, R. W., and Sweedler, J. V. 2000. Single-cell MALDI: A new tool for direct peptide profiling. *Trends Biotechnol.* 18: 151–

160.
Yates, J. R., 3d. 1998. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J. Mass Spectrom.* 33:1–19.
Pappin, D. J. 1997. Peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.* 64:165–173.
Schuster, T. M., and Laue, T. M. 1994. *Modern Analytical Ultracentrifugation.* Springer Verlag.
Arnott, D., Shabanowitz, J., and Hunt, D. F. 1993. Mass spectrometry of proteins and peptides: Sensitive and accurate mass measurement and sequence analysis. *Clin. Chem.* 39:2005–2010.
Chait, B. T., and Kent, S. B. H. 1992. Weighing naked proteins: Practical, high-accuracy mass measurement of peptides and proteins. *Science* 257:1885–1894.
Edmonds, C. G., Loo, J. A., Loo, R. R., Udseth, H. R., Barinaga, C. J., and Smith, R. D. 1991. Application of electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry in combination with capillary electrophoresis for biochemical investigations. *Biochem. Soc. Trans.* 19:943–947.
Jardine, I. 1990. Molecular weight analysis of proteins. *Methods Enzymol.* 193:441–455.

Proteômicas

Yates, J. R., 3d. 2004. Mass spectral analysis in proteomics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33:297–316.
Weston, A. D., and Hood, L. 2004. Systems biology, proteomics, and the future of health care: Toward predictive, preventative, and personalized medicine. *J. Proteome Res.* 3:179–196.
Pandey, A., and Mann, M. 2000. Proteomics to study genes and ge-nomes. *Nature* 405:837–846.
Dutt, M. J., and Lee, K. H. 2000. Proteomic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:176–179.
Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprapto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., and Chait, B. T. 2000. The yeast nuclear pore complex: Composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.* 148:635–651.

Cristalografia de Raios X e Espectroscopia de Ressonância Magnética

Rhodes, G. 2006. *Crystallography Made Crystal Clear.* Elsevier/ Academic Press.
Moffat, K. 2003. The frontiers of time-resolved macromolecular crystallography: Movies and chirped X-ray pulses. *Faraday Discuss.* 122:65–88.
Bax, A. 2003. Weak alignment offers new NMR opportunities to study protein structure and dynamics. *Protein Sci.* 12:1–16.
Wery, J. P., and Schevitz, R. W. 1997. New trends in macromolecular x-ray crystallography. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:365–369.
Glusker, J. P. 1994. X-ray crystallography of proteins. *Methods Biochem. Anal.* 37:1–72.
Clore, G. M., and Gronenborn, A. M. 1991. Structures of larger proteins in solution: Three- and four-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy. *Science* 252:1390–1399.
Wüthrich, K. 1989. Protein structure determination in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science* 243:45–50.
Wüthrich, K. 1986. *NMR of Proteins and Nucleic Acids.* Wiley-Interscience.

Anticorpos Monoclonais e Moléculas Fluorescentes

Immunology Today. 2000. Volume 21, issue 8.
Tsien, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67:509–544.
Kendall, J. M., and Badminton, M. N. 1998. *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting era. *Trends Biotechnol.* 16:216–234.
Goding, J. W. 1996. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice.* Academic Press.
Köhler, G., and Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495–497.

Síntese Química das Proteínas

Bang, D., Chopra, N., and Kent, S. B. 2004. Total chemical synthesis of crambin. *J. Am. Chem. Soc.* 126:1377–1383.
Dawson, P. E., and Kent, S. B. 2000. Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu. Rev. Biochem.* 69:923–960.
Mayo, K. H. 2000. Recent advances in the design and construction of synthetic peptides: For the love of basics or just for the technology of it. *Trends Biotechnol.* 18:212–217.

Capítulo 4

Literatura Básica

Felsenfeld, G. 1985. DNA. *Sci. Am.* 253(4):58–67.
Darnell, J. E., Jr. 1985. RNA. *Sci. Am.* 253(4):68–78.
Dickerson, R. E. 1983. The DNA helix and how it is read. *Sci. Am.* 249(6):94–111.
Crick, F. H. C. 1954. The structure of the hereditary material. *Sci. Am.*191(4): 54–61.

Chambon, P. 1981. Split genes. *Sci. Am.* 244(5):60–71.
Watson, J. D., and Crick, F. H. C. 1953. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737–738.
Watson, J. D., and Crick, F. H. C. 1953. Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171:964–967.
Meselson, M., and Stahl, F. W. 1958. The replication of DNA in *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 44:671–682.

Livros

Bloomfield, V. A., Crothers, D. M., Tinoco, I., and Hearst, J. 2000. *Nucleic Acids: Structures, Properties, and Functions.* University Science Books.
Singer, M., and Berg, P. 1991. *Genes and Genomes: A Changing Perspective.* University Science Books.
Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., and Matsudaira, P. 2007. *Molecular Cell Biology* (6th ed.). W. H. Freeman and Company.
Lewin, B. 2007. *Genes IX.* Jones and Bartlett.
Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., and Losick, R. 2007. *Molecular Biology of the Gene* (6th ed.). Benjamin Cummings.

Estrutura do DNA

Neidle, S. 2007. *Principles of Nucleic Acid Structure.* Academic Press.
Dickerson, R. E., Drew, H. R., Conner, B. N., Wing, R. M., Fratini, A. V., and Kopka, M. L. 1982. The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. *Science* 216:475–485.
Sinden, R. R. 1994. *DNA Structure and Function.* Academic Press.

Replicação do DNA

Lehman, I. R. 2003. Discovery of DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 278:34733–34738.
Hübscher, U., Maga, G., and Spardari, S. 2002. Eukaryotic DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* 71:133–163.
Hübscher, U., Nasheuer, H.-P., and Syväoja, J. E. 2000. Eukaryotic DNA polymerases: A growing family. *Trends Biochem. Sci.* 25:143–147.
Brautigam, C. A., and Steitz, T. A. 1998. Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:54–63.
Kornberg, A., and Baker, T. A. 1992. *DNA Replication* (2d ed.). W. H. Freeman and Company.

Descoberta do RNA Mensageiro

Jacob, F., and Monod, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3:318–356.
Brenner, S., Jacob, F., and Meselson, M. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190:576–581.
Hall, B. D., and Spiegelman, S. 1961. Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 47:137–146.

Código Genético

Koonin, E. V., and Novozhilov, A. S. 2009. Origin and evolution of the genetic code: The universal enigma. *IUBMB Life* 61:99–111.
Yarus, M., Caporaso, J. G., and Knight, R. 2005. Origins of the genetic code: The escaped triplet theory. *Annu. Rev. Biochem.* 74:179–198.
Freeland, S. J., and Hurst, L. D. 2004. Evolution encoded. *Sci. Am.* 290(4):84–91.
Crick, F. H. C., Barnett, L., Brenner, S., and Watts-Tobin, R. J. 1961. General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192:1227–1232.
Woese, C. R. 1967. *The Genetic Code.* Harper & Row.
Knight, R. D., Freeland, S. J., and Landweber L. F. 1999. Selection, history and chemistry: The three faces of the genetic code. *Trends Biochem. Sci.* 24(6):241–247.

Íntrons, Éxons, e Genes Divididos

Liu, M., and Grigoriev, A. 2004. Protein domains correlate strongly with exons in multiple eukaryotic genomes—evidence of exon shuffling? *Trends Genet.* 20:399–403.
Dorit, R. L., Schoenbach, L., and Gilbert, W. 1990. How big is the universe of exons? *Science* 250:1377–1382.
Cochet, M., Gannon, F., Hen, R., Maroteaux, L., Perrin, F., and Chambon, P. 1979. Organization and sequence studies of the 17-piece chicken conalbumin gene. *Nature* 282:567–574.
Tilghman, S. M., Tiemeier, D. C., Seidman, J. G., Peterlin, B. M., Sullivan, M., Maizel, J. V., and Leder, P. 1978. Intervening sequence of

DNA identified in the structural portion of a mouse β-globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:725–729.

Explicação Histórica e Reminiscente

Nirenberg, M. 2004. Deciphering the genetic code—a personal account. *Trends Biochem. Sci.* 29:46–54.
Clayton, J., and Dennis, C. (Eds.). 2003. *50 Years of DNA.* Palgrave Macmillan.
Watson, J. D. 1968. *The Double Helix.* Atheneum.
McCarty, M. 1985. *The Transforming Principle: Discovering That Genes Are Made of DNA.* Norton.
Cairns, J., Stent, G. S., and Watson, J. D. 2000. *Phage and the Origins of Molecular Biology.* Cold Spring Harbor Laboratory.
Olby, R. 1974. *The Path to the Double Helix.* University of Washington Press.
Portugal, F. H., and Cohen, J. S. 1977. *A Century of DNA: A History of the Discovery of the Structure and Function of the Genetic Substance.* MIT Press.
Judson, H. F. 1996. *The Eighth Day of Creation.* Cold Spring Harbor Laboratory.
Sayre, A. 2000. *Rosalind Franklin and DNA.* Norton.

Capítulo 5

Literatura Básica

Berg, P. 1981. Dissections and reconstructions of genes and chromosomes. *Science* 213:296–303.
Gilbert, W. 1981. DNA sequencing and gene structure. *Science* 214:1305–1312.
Sanger, F. 1981. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 214:1205–1210.
Mullis, K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262(4):56–65.

Livros sobre Tecnologia do DNA Recombinante

Watson, J. D., Myers, R. M., Caudy, A. A., and Witkowski, J. 2007. *Recombinant DNA: Genes and Genomes* (3d ed.). W. H. Freeman and Company.
Grierson, D. (Ed.). 1991. *Plant Genetic Engineering.* Chapman and Hall.
Mullis, K. B., Ferré, F., and Gibbs, R. A. (Eds.). 1994. *The Polymerase Chain Reaction.* Birkhaüser.
Russel, D., Sambrook, J., and Russel, D. 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3d ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., and Moore, D. D. (Eds.). 1999. *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology.* Wiley.
Birren, B., Green, E. D., Klapholz, S., Myers, R. M., Roskams, J., Riethamn, H., and Hieter, P. (Eds.). 1999. *Genome Analysis* (vols. 1–4). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Methods in Enzymology. Academic Press. [Many volumes in this series deal with recombinant DNA technology.]

Síntese e Sequência de DNA

Hunkapiller, T., Kaiser, R. J., Koop, B. F., and Hood, L. 1991. Large-scale and automated DNA sequence determination. *Science* 254:59–67.
Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:5463–5467.
Maxam, A. M., and Gilbert, W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:560–564.
Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., Heiner, C., Kent, S. B. H., and Hood, L. E. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321:674–679.
Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., Cronin, M. T., Holmes, C. P., and Fodor, S. P. A. 1994. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:5022–5026.
Venter, J. C., Adams, M. D., Sutton, G. G., Kerlavage, A. R., Smith, H. O., and Hunkapiller, M. 1998. Shotgun sequencing of the human genome. *Science* 280:1540–1542.
Mardis, E. R. 2008. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9:387–402.

Reação em Cadeia da Polimerase

Arnheim, N., and Erlich, H. 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61:131–156.
Kirby, L. T. (Ed.). 1997. *DNA Fingerprinting: An Introduction.* Stockton Press.
Eisenstein, B. I. 1990. The polymerase chain reaction: A new method for using molecular genetics for medical diagnosis. *N. Engl. J. Med.* 322:178–183.
Foley, K. P., Leonard, M. W., and Engel, J. D. 1993. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Trends Genet.* 9:380–

386.
Pääbo, S. 1993. Ancient DNA. *Sci. Am.* 269(5):86–92.
Hagelberg, E., Gray, I. C., and Jeffreys, A. J. 1991. Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 352:427–429.
Lawlor, D. A., Dickel, C. D., Hauswirth, W. W., and Parham, P. 1991. Ancient HLA genes from 7500-year-old archaeological remains. *Nature* 349:785–788.
Krings, M., Geisert, H., Schmitz, R. W., Krainitzki, H., and Pääbo, S. 1999. DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II for the Neanderthal type specimen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:5581–5585.
Ovchinnikov, I. V., Götherström, A., Romanova, G. P., Kharitonov, V. M., Lidén, K., and Goodwin, W. 2000. Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature* 404:490–493.

Sequenciamento do Genoma

International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431:931–945.
Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921.
Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291:1304–1351.
Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520–562.
Koonin, E. V. 2003. Comparative genomics, minimal gene-sets and the last universal common ancestor. *Nat. Rev. Microbiol.* 1:127–236.
Gilligan, P., Brenner, S., and Venkatesh, B. 2002. Fugu and human sequence comparison identifies novel human genes and conserved non-coding sequences. *Gene* 294:35–44.
Enard, W., and Pääbo, S. 2004. Comparative primate genomics. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 5:351–378.

PCR Quantitativa e Microarranjos de DNA

Duggan, D. J., Bittner, J. M., Chen, Y., Meltzer, P., and Trent, J. M. 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat. Genet.* 21:10–14.
Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D., and Lander, E. S. 1999. Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286:531–537.
Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffery, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O., and Botstein, D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747–752.
Walker, N. J. 2002. A technique whose time has come. *Science* 296:557–559.

Introdução dos Genes nas Células Animais

Anderson, W. F. 1992. Human gene therapy. *Science* 256:808–813.
Friedmann, T. 1997. Overcoming the obstacles to gene therapy. *Sci. Am.* 277(6):96–101.
Blaese, R. M. 1997. Gene therapy for cancer. *Sci. Am.* 277 (6): 111–115.
Brinster, R. L., and Palmiter, R. D. 1986. Introduction of genes into the germ lines of animals. *Harvey Lect.* 80:1–38.
Capecchi, M. R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288–1292.
Hasty, P., Bradley, A., Morris, J. H., Edmondson, D. G., Venuti, J. M., Olson, E. N., and Klein, W. H. 1993. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364:501–506.
Parkmann, R., Weinberg, K., Crooks, G., Nolta, J., Kapoor, N., and Kohn, D. 2000. Gene therapy for adenosine deaminase deficiency. *Annu. Rev. Med.* 51:33–47.

RNAde Interferência

Rana, T. M. 2007. Illuminating the silence: Understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:23–36.
Novina, C. D., and Sharp, P. A. 2004. The RNAi revolution. *Nature* 430:161–164.
Hannon, G. J., and Rossi, J. J. 2004. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431:371–378.
Meister, G., and Tuschl, T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431:343–349.
Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494–498.
Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by

doublestranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811.

Engenharia Genética das Plantas

Gasser, C. S., and Fraley, R. T. 1992. Transgenic crops. *Sci. Am.* 266(6):62–69.
Gasser, C. S., and Fraley, R. T. 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. *Science* 244:1293–1299.
Shimamoto, K., Terada, R., Izawa, T., and Fujimoto, H. 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338:274–276.
Chilton, M.-D. 1983. A vector for introducing new genes into plants. *Sci. Am.* 248(6):50–59.
Hansen, G., and Wright, M. S. 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.* 4:226–231.
Hammond, J. 1999. Overview: The many uses of transgenic plants. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:1–20.
Finer, J. J., Finer, K. R., and Ponappa, T. 1999. Particle bombardment mediated transformation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:60–80.

Esclerose Lateral Amiotrófica

Siddique, T., Figlewicz, D. A., Pericak-Vance, M. A., Haines, J. L., Rouleau, G., Jeffers, A. J., Sapp, P., Hung, W.-Y., Bebout, J., McKenna-Yasek, D., et al. 1991. Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. *New Engl. J. Med.* 324:1381–1384.
Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H.-X., et al. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59–62.
Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H.-X., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R. L., and Siddique, T. 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772–1774.
Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. S., Guarnieri, M., Xu, Z.-S., Wong, P. C. Brown, R. H., Jr., Price, D. L., Sisodia, S. S., and Cleveland, D. W. 1994. Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:8292–8296.

Capítulo 6

Livros

Claverie, J.-M., and Notredame, C. 2003. *Bioinformatics for Dummies.* Wiley.
Pevsner, J. 2003. *Bioinformatics and Functional Genomics.* Wiley-Liss.
Doolittle, R. F. 1987. *Of URFS and ORFS.* University Science Books.

Alinhamento de Sequências

Schaffer, A. A., Aravind, L., Madden, T. L., Shavirin, S., Spouge, J. L., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., and Altschul, S. F. 2001. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res.* 29:2994–3005.
Henikoff, S., and Henikoff, J. G. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10915–10919.
Johnson, M. S., and Overington, J. P. 1993. A structural basis for sequence comparisons: An evaluation of scoring methodologies. *J. Mol. Biol.* 233:716–738.
Eddy, S. R. 2004. Where did the BLOSUM62 alignment score matrix come from? *Nat. Biotechnol.* 22:1035–1036.
Aravind, L., and Koonin, E. V. 1999. Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches. *J. Mol. Biol.* 287:1023–1040.
Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389–3402.

Comparação das Estruturas

Orengo, C. A., Bray, J. E., Buchan, D. W., Harrison, A., Lee, D., Pearl, F. M., Sillitoe, I., Todd, A. E., and Thornton, J. M. 2002. The CATH protein family database: A resource for structural and functional annotation of genomes. *Proteomics* 2:11–21.
Bashford, D., Chothia, C., and Lesk, A. M. 1987. Determinants of a protein fold: Unique features of the globin amino acid sequences. *J. Mol. Biol.* 196:199–216.
Harutyunyan, E. H., Safonova, T. N., Kuranova, I. P., Popov, A. N., Teplyakov, A. V., Obmolova, G. V., Rusakov, A. A., Vainshtein, B. K., Dodson, G. G., Wilson, J. C., et al. 1995. The structure of deoxy- and oxy-leghaemoglobin from lupin. *J. Mol. Biol.* 251:104–115.
Flaherty, K. M., McKay, D. B., Kabsch, W., and Holmes, K. C. 1991. Similarity of the three-dimensional structures of actin and the

ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:5041–5045.
Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T., and Chothia, C. 1995. SCOP: A structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* 247: 536–540.
Hadley, C., and Jones, D. T. 1999. A systematic comparison of protein structure classification: SCOP, CATH and FSSP. *Struct. Fold. Des.* 7:1099–1112.

Detecção de Domínio

Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., DeWeese-Scott, C., Fedorova, N. D., Geer, L. Y., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Madej, T., Marchler, G. H., Mazumder, R., Nikolskaya, A. N., Panchenko, A. R., Rao, B. S., Shoemaker, B. A., Simonyan, V., Song, J. S., Thiessen, P. A., Vasudevan, S., Wang, Y., Yamashita, R. A., Yin, J. J., and Bryant, S. H. 2003. CDD: A curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Res.* 31:383–387.
Ploegman, J. H., Drent, G., Kalk, K. H., and Hol, W. G. 1978. Structure of bovine liver rhodanese I: Structure determination at 2.5 Å resolution and a comparison of the conformation and sequence of its two domains. *J. Mol. Biol.* 123:557–594.
Nikolov, D. B., Hu, S. H., Lin, J., Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Chua, N. H., Roeder, R. G., and Burley, S. K. 1992. Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature* 360: 40–46.
Doolittle, R. F. 1995. The multiplicity of domains in proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 64:287–314.
Heger, A., and Holm, L. 2000. Rapid automatic detection and alignment of repeats in protein sequences. *Proteins* 41:224–237.

Árvores Evolutivas

Wolf, Y. I., Rogozin, I. B., Grishin, N. V., and Koonin, E. V. 2002. Genome trees and the tree of life. *Trends Genet.* 18:472–479.
Doolittle, R. F. 1992. Stein and Moore Award address. Reconstructing history with amino acid sequences. *Protein Sci.* 1:191–200.
Zuckerkandl, E., and Pauling, L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* 8:357–366.

Sequência Antiga de DNA

Green, R. E., Malaspinas, A.-S., Krause, J., Briggs, A. W., Johnson, P. L. F., Uhler, C., Meyer, M., Good, J. M., Maricic, T., Stenzel, U., Prüfer, K., Siebauer, M., Burbano, H. A., Ronan, M., Rothberg, J. M., Egholm, M., Rudan, P., Brajković, D., Kućan, Ž., Gužić, I., Wikström, M., Laakkonen, L., Kelso, J., Slatkin, M., and Pääbo, S. 2008. A complete Neandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing. *Cell* 134:416–426.
Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Despres, V., Hebler, J., Rohland, N., Kuch, M., Krause, J., Vigilant, L., and Hofreiter, M. 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.* 38:645–679.
Krings, M., Stone, A., Schmitz, R. W., Krainitzki, H., Stoneking, M., and Pääbo, S. 1997. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90:19–30.
Krings, M., Geisert, H., Schmitz, R. W., Krainitzki, H., and Pääbo, S. 1999. DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neanderthal type specimen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:5581–5585.

Evolução no Laboratório

Sassanfar, M., and Szostak, J. W. 1993. An RNA motif that binds ATP. *Nature* 364:550–553.
Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O., and Yarus, M. 1995. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu. Rev. Biochem.* 64:763–797.
Wilson, D. S., and Szostak, J. W. 1999. In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem.* 68:611–647.
Hermann, T., and Patel, D. J. 2000. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* 287:820–825.

Web Sites

The Protein Data Bank (PDB) site is the repository for three-dimensional macromolecular structures. It currently contains more than 30,000 structures. (http://www.rcsb.org/pdb/).
National Center for Biotechnology Information (NCBI) contains molecular biological databases and software for analysis. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Capítulo 7

Literatura Básica

Perutz, M. F. 1978. Hemoglobin structure and respiratory transport. *Sci. Am.* 239(6):92–125.
Perutz, M. F. 1980. Stereochemical mechanism of oxygen transport by haemoglobin. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 208:135–162.
Kilmartin, J. V. 1976. Interaction of haemoglobin with protons, CO_2, and 2,3-diphosphoglycerate. *Brit. Med. Bull.* 32:209–222.

Estrutura

Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H., and Phillips, D. C. 1958. A three-dimensional model of the

myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* 181:662–666.
Shaanan, B. 1983. Structure of human oxyhaemoglobin at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 171:31–59.
Frier, J. A., and Perutz, M. F. 1977. Structure of human foetal deoxyhaemoglobin. *J. Mol. Biol.* 112:97–112.
Perutz, M. F. 1969. Structure and function of hemoglobin. *Harvey Lect.* 63:213–261.
Perutz, M. F. 1962. Relation between structure and sequence of haemoglobin. *Nature* 194:914–917.

Interação da Hemoglobina com Efetores Alostéricos

Benesch, R., and Beesch, R. E. 1969. Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by haemoglobin. *Nature* 221:618–622.
Fang, T. Y., Zou, M., Simplaceanu, V., Ho, N. T., and Ho, C. 1999. Assessment of roles of surface histidyl residues in the molecular basis of the Bohr effect and of b 143 histidine in the binding of 2,3-bisphosphoglycerate in human normal adult hemoglobin. *Biochemistry* 38:13423–13432.
Arnone, A. 1992. X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin. *Nature* 237:146–149.

Modelos para Cooperatividade

Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J.-P. 1965. On the nature of allosteric interactions: A plausible model. *J. Mol. Biol.* 12:88–118.
Koshland, D. L., Jr., Nemethy, G., and Filmer, D. 1966. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5:365–385.
Ackers, G. K., Doyle, M. L., Myers, D., and Daugherty, M. A. 1992. Molecular code for cooperativity in hemoglobin. *Science* 255: 54–63.

Anemia Falciforme e Talassemia

Herrick, J. B. 1910. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch. Intern. Med.* 6: 517–521.
Pauling, L., Itano, H. A., Singer, S. J., and Wells, L. C. 1949. Sickle cell anemia: A molecular disease. *Science* 110:543–548.
Ingram, V. M. 1957. Gene mutation in human hemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature* 180:326–328.
Eaton, W. A., and Hofrichter, J. 1990. Sickle cell hemoglobin polymerization. *Adv. Prot. Chem.* 40:63–279.
Weatherall, D. J. 2001. Phenotype genotype relationships in monogenic disease: Lessons from the thalassemias. *Nat. Rev. Genet.* 2:245–255.

Proteínas Globina de Ligação e Outras Globinas

Kihm, A. J., Kong, Y., Hong, W., Russell, J. E., Rouda, S., Adachi, K., Simon, M. C., Blobel, G. A., and Weiss, M. J. 2002. An abundant erythroid protein that stabilizes free α-haemoglobin. *Nature* 417:758–763.
Feng, L., Zhou, S., Gu, L., Gell, D. A., Mackay, J. P., Weiss, M. J., Gow, A. J., and Shi, Y. 2005. Structure of oxidized α-haemoglobin bound to AHSP reveals a protective mechanism for haem. *Nature* 435:697–701.
Yu, X., Kong, Y., Dore, L. C., Abdulmalik, O., Katein, A. M., Zhou, S., Choi, J. K., Gell, D., Mackay, J. P., Gow, A. J., and Weiss, M. J. 2007. An erythroid chaperone that facilitates folding of α-globin subunits for hemoglobin synthesis. *J. Clin. Invest.* 117:1856–1865.
Burmester, T., Haberkamp, M., Mitz, S., Roesner, A., Schmidt, M., Ebner, B., Gerlach, F., Fuchs, C., and Hankeln, T. 2004. Neuroglobin and cytoglobin: Genes, proteins and evolution. *IUBMB Life* 56:703–707.
Hankeln, T., Ebner, B., Fuchs, C., Gerlach, F., Haberkamp, M., Laufs, T. L., Roesner, A., Schmidt, M., Weich, B., Wystub, S., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Bolognesi, M., De Sanctis, D., Marden, M. C., Kiger, L., Moens, L., Dewilde, S., Nevo, E., Avivi, A., Weber, R. E., Fago, A., and Burmester, T. 2005. Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *J. Inorg. Biochem.* 99:110–119.
Burmester, T., Ebner, B., Weich, B., and Hankeln, T. 2002. Cytoglobin: A novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol. Biol. Evol.* 19:416–421.
Zhang, C., Wang, C., Deng, M., Li, L., Wang, H., Fan, M., Xu, W., Meng, F., Qian, L., and He, F. 2002. Full-length cDNA cloning of human neuroglobin and tissue expression of rat neuroglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290:1411–1419

Capítulo 8

Literatura Básica

Zalatan, J. G., and Herschlag, D. 2009. The far reaches of enzymology. *Nat. Chem. Biol.* 5:516–520.
Hammes, G. G. 2008. How do enzymes really work? *J. Biol. Chem.* 283:22337–22346.
Koshland, D. E., Jr. 1987. Evolution of catalytic function. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52:1–7.

Jencks, W. P. 1987. Economics of enzyme catalysis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52:65–73.
Lerner, R. A., and Tramontano, A. 1988. Catalytic antibodies. *Sci. Am.* 258(3):58–70.

Livros

Cook, P. F., and Cleland, W. W. 2007. *Enzyme Kinetics and Mechanism.* Garland Press.
Fersht, A. 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding.* W. H. Freeman and Company.
Walsh, C. 1979. *Enzymatic Reaction Mechanisms.* W. H. Freeman and Company.
Page, M. I., and Williams, A. (Eds.). 1987. *Enzyme Mechanisms.* Royal Society of Chemistry.
Bender, M. L., Bergeron, R. J., and Komiyama, M. 1984. *The Bioorganic Chemistry of Enzymatic Catalysis.* Wiley-Interscience.
Abelson, J. N., and Simon, M. I. (Eds.). 1992. *Methods in Enzymology.* Academic Press.
Boyer, P. D. (Ed.). 1970. *The Enzymes* (3d ed.). Academic Press.
Friedmann, H. C. (Ed.). 1981. *Benchmark Papers in Biochemistry.* Vol. 1, *Enzymes.* Hutchinson Ross.

Estabilização do Estado de Transição, Análogos, e Outras Enzimas Inibidoras

Schramm, V. L. 2007. Enzymatic transition state theory and transition state analog design. *J. Biol. Chem.* 282:28297–28300.
Pauling, L. 1948. Nature of forces between large molecules of biological interest. *Nature* 161:707–709.
Leinhard, G. E. 1973. Enzymatic catalysis and transition-state theory. *Science* 180:149–154.
Kraut, J. 1988. How do enzymes work? Science 242:533–540.
Waxman, D. J., and Strominger, J. L. 1983. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of β-lactam antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* 52:825–869.
Abraham, E. P. 1981. The b-lactam antibiotics. *Sci. Am.* 244:76–86.
Walsh, C. T. 1984. Suicide substrates, mechanism-based enzyme inactivators: Recent developments. *Annu. Rev. Biochem.* 53:493–535.

Anticorpos Catalíticos

Hilvert, D. 2000. Critical analysis of antibody catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 69:751–794.
Wade, H., and Scanlan, T. S. 1997. The structural and functional basis of antibody catalysis. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:461–493.
Lerner, R. A., Benkovic, S. J., and Schultz, P. G. 1991. At the crossroads of chemistry and immunology: Catalytic antibodies. *Science* 252:659–667.
Cochran, A. G., and Schultz, P. G. 1990. Antibody-catalyzed porphyrin metallation. *Science* 249:781–783.

Cinética Enzimática e Mecanismos

Hammes-Schiller, S. and Benkovic, S. J. 2006. Relating protein motion to catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 75:519–541.
Benkovic, S. J., and Hammes-Schiller, S. 2003. A perspective on enzyme catalysis. *Science* 301:1196–1202.
Hur, S., and Bruice, T. C. 2003. The near attack conformation approach to the study of the chorismate to prephenate reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:12015–12020.
Xie, X. S., and Lu, H. P. 1999. Single-molecule enzymology. *J. Biol. Chem.* 274:15967–15970.
Miles, E. W., Rhee, S., and Davies, D. R. 1999. The molecular basis of substrate channeling. *J. Biol. Chem.* 274:12193–12196.
Warshel, A. 1998. Electrostatic origin of the catalytic power of enzymes and the role of preorganized active sites. *J. Biol. Chem.* 273:27035–27038.
Cannon, W. R., and Benkovic, S. J. 1999. Solvation, reorganization energy, and biological catalysis. *J. Biol. Chem.* 273:26257–26260.
Cleland, W. W., Frey, P. A., and Gerlt, J. A. 1998. The low barrier hydrogen bond in enzymatic catalysis. *J. Biol. Chem.* 273:25529–25532.
Romesberg, F. E., Santarsiero, B. D., Spiller, B., Yin, J., Barnes, D., Schultz, P. G., and Stevens, R. C. 1998. Structural and kinetic evidence for strain in biological catalysis. *Biochemistry* 37:14404– 14409.
Lu, H. P., Xun, L., and Xie, X. S. 1998. Single-molecule enzymatic dynamics. *Science* 282:1877–1882.
Fersht, A. R., Leatherbarrow, R. J., and Wells, T. N. C. 1986. Binding energy and catalysis: A lesson from protein engineering of the tyrosyl-tRNA synthetase. *Trends Biochem. Sci.* 11:321–325.
Jencks, W. P. 1975. Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: The Circe effect. *Adv. Enzymol.* 43:219–410.
Knowles, J. R., and Albery, W. J. 1976. Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency. *Biochemistry* 15:5631–5640.

Capítulo 9

Literatura Básica

Stroud, R. M. 1974. A family of protein-cutting proteins. *Sci. Am.* 231(1):74–88.

Kraut, J. 1977. Serine proteases: Structure and mechanism of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 46:331–358.

Lindskog, S. 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol. Ther.* 74:1–20.

Jeltsch, A., Alves, J., Maass, G., and Pingoud, A. 1992. On the catalytic mechanism of *Eco*RI and *Eco*RV: A detailed proposal based on biochemical results, structural data and molecular modelling. *FEBS Lett.* 304:4–8.

Bauer, C. B., Holden, H. M., Thoden, J. B., Smith, R., and Rayment, I. 2000. X-ray structures of the apo and MgATP-bound states of *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain. *J. Biol. Chem.* 275:38494–38499.

Lolis, E., and Petsko, G. A. 1990. Transition-state analogues in protein crystallography: Probes of the structural source of enzyme catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 59:597–630.

Livros

Fersht, A. 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding.* W. H. Freeman and Company.

Silverman, R. B. 2000. *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions.* Academic Press.

Page, M., and Williams, A. 1997. *Organic and Bio-organic Mechanisms.* Addison Wesley Longman.

Quimiotripsina e Outras Serina Proteases

Fastrez, J., and Fersht, A. R. 1973. Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. *Biochemistry* 12:2025–2034.

Sigler, P. B., Blow, D. M., Matthews, B. W., and Henderson, R. 1968. Structure of crystalline-chymotrypsin II: A preliminary report including a hypothesis for the activation mechanism. *J. Mol. Biol.* 35:143–164.

Kossiakoff, A. A., and Spencer, S. A. 1981. Direct determination of the protonation states of aspartic acid-102 and histidine-57 in the tetrahedral intermediate of the serine proteases: Neutron structure of trypsin. *Biochemistry* 20:6462–6474.

Carter, P., and Wells, J. A. 1988. Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature* 332:564–568.

Carter, P., and Wells, J. A. 1990. Functional interaction among catalytic residues in subtilisin BPN'. *Proteins* 7:335–342.

Koepke, J., Ermler, U., Warkentin, E., Wenzl, G., and Flecker, P. 2000. Crystal structure of cancer chemopreventive Bowman-Birk inhibitor in ternary complex with bovine trypsin at 2.3 Å resolution: Structural basis of Janus-faced serine protease inhibitor specificity. *J. Mol. Biol.* 298:477–491.

Gaboriaud, C., Rossi, V., Bally, I., Arlaud, G. J., and Fontecilla-Camps, J. C. 2000. Crystal structure of the catalytic domain of human complement C1s: A serine protease with a handle. *EMBO J.* 19:1755–1765.

Outras Proteases

Vega, S., Kang, L. W., Velazquez-Campoy, A., Kiso, Y., Amzel, L. M., and Freire, E. 2004. A structural and thermodynamic escape mechanism from a drug resistant mutation of the HIV-1 protease. *Proteins* 55:594–602.

Kamphuis, I. G., Kalk, K. H., Swarte, M. B., and Drenth, J. 1984. Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 179:233–256.

Kamphuis, I. G., Drenth, J., and Baker, E. N. 1985. Thiol proteases: Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain. *J. Mol. Biol.* 182:317–329.

Sivaraman, J., Nagler, D. K., Zhang, R., Menard, R., and Cygler, M. 2000. Crystal structure of human procathepsin X: A cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine. *J. Mol. Biol.* 295:939–951.

Davies, D. R. 1990. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19:189–215.

Dorsey, B. D., Levin, R. B., McDaniel, S. L., Vacca, J. P., Guare, J. P., Darke, P. L., Zugay, J. A., Emini, E. A., Schleif, W. A., Quintero, J. C., et al. 1994. L-735,524: The design of a potent and orally bioavailable HIV protease inhibitor. *J. Med. Chem.* 37:3443–3451.

Chen, Z., Li, Y., Chen, E., Hall, D. L., Darke, P. L., Culberson, C., Shafer, J. A., and Kuo, L. C. 1994. Crystal structure at 1.9-Å resolution of human immunodeficiency virus (HIV) II protease complexed with L-735,524, an orally bioavailable inhibitor of the HIV proteases. *J. Biol. Chem.* 269:26344–26348.

Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., et al. 1992. The *a/b* hydrolase fold. *Protein Eng.* 5:197–211.

Anidrase Carbônica

Strop, P., Smith, K. S., Iverson, T. M., Ferry, J. G., and Rees, D. C. 2001. Crystal structure of the "cab"-type beta class carbonic anhydrase from the archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum. J. Biol. Chem.* 276:10299–10305.

Lindskog, S., and Coleman, J. E. 1973. The catalytic mechanism of carbonic anhydrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70:2505–2508.

Kannan, K. K., Notstrand, B., Fridborg, K., Lovgren, S., Ohlsson, A., and Petef, M. 1975. Crystal structure of human erythrocyte

carbonic anhydrase B: Three-dimensional structure at a nominal 2.2-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:51–55.
Boriack-Sjodin, P. A., Zeitlin, S., Chen, H. H., Crenshaw, L., Gross, S., Dantanarayana, A., Delgado, P., May, J. A., Dean, T., and Christianson, D. W. 1998. Structural analysis of inhibitor binding to human carbonic anhydrase II. *Protein Sci.* 7:2483–2489.
Wooley, P. 1975. Models for metal ion function in carbonic anhydrase. *Nature* 258:677–682.
Jonsson, B. H., Steiner, H., and Lindskog, S. 1976. Participation of buffer in the catalytic mechanism of carbonic anhydrase. *FEBS Lett.* 64:310–314.
Sly, W. S., and Hu, P. Y. 1995. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem.* 64:375–401.
Maren, T. H. 1988. The kinetics of HCO_3^- synthesis related to fluid secretion, pH control, and CO_2 elimination. *Annu. Rev. Physiol.* 50:695–717.
Kisker, C., Schindelin, H., Alber, B. E., Ferry, J. G., and Rees, D. C. 1996. A left-hand beta-helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *EMBO J.* 15:2323–2330.

Enzimas de Restrição

Selvaraj, S., Kono, H., and Sarai, A. 2002. Specificity of protein-DNA recognition revealed by structure-based potentials: Symmetric/asymmetric and cognate/non-cognate binding. *J. Mol. Biol.* 322:907–915.
Winkler, F. K., Banner, D. W., Oefner, C., Tsernoglou, D., Brown, R. S., Heathman, S. P., Bryan, R. K., Martin, P. D., Petratos, K., and Wilson, K. S. 1993. The crystal structure of *Eco*RV endonuclease and of its complexes with cognate and non-cognate DNA fragments. *EMBO J.* 12:1781–1795.
Kostrewa, D., and Winkler, F. K. 1995. Mg^{2+} binding to the active site of *Eco*RV endonuclease: A crystallographic study of complexes with substrate and product DNA at 2 Å resolution. *Biochemistry* 34:683–696.
Athanasiadis, A., Vlassi, M., Kotsifaki, D., Tucker, P. A., Wilson, K. S., and Kokkinidis, M. 1994. Crystal structure of *Pvu*II endonuclease reveals extensive structural homologies to *Eco*RV. *Nat. Struct. Biol.* 1:469–475.
Sam, M. D., and Perona, J. J. 1999. Catalytic roles of divalent metal ions in phosphoryl transfer by *Eco*RV endonuclease. *Biochemistry* 38:6576–6586.
Jeltsch, A., and Pingoud, A. 1996. Horizontal gene transfer contributes to the wide distribution and evolution of type II restrictionmodification systems. *J. Mol. Evol.* 42:91–96.

Miosinas

Grigorenko, B. L., Rogov, A. V., Topol, I. A., Burt, S. K., Martinez, H. M., and Nemukhin, A. V. 2007. Mechanism of the myosin catalyzed hydrolysis of ATP as rationalized by molecular modeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:7057–7061.
Gulick, A. M., Bauer, C. B., Thoden, J. B., and Rayment, I. 1997. X-ray structures of the MgADP, MgATPgS, and MgAMPPNP complexes of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain. *Biochemistry* 36:11619–11628.
Kovacs, M., Malnasi-Csizmadia, A., Woolley, R. J., and Bagshaw, C. R. 2002. Analysis of nucleotide binding to *Dictyostelium* myosin II motor domains containing a single tryptophan near the active site. *J. Biol. Chem.* 277:28459–28467.
Kuhlman, P. A., and Bagshaw, C. R. 1998. ATPase kinetics of the *Dictyostelium discoideum* myosin II motor domain. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 19:491–504.
Smith, C. A., and Rayment, I. 1996. X-ray structure of the magnesium(II) ADP vanadate complex of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain to 1.9 Å resolution. *Biochemistry* 35: 5404–5417.

Capítulo 10

Literatura Básica

Kantrowitz, E. R., and Lipscomb, W. N. 1990. *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase: The molecular basis for a concerted allosteric transition. *Trends Biochem. Sci.* 15:53–59.
Schachman, H. K. 1988. Can a simple model account for the allosteric transition of aspartate transcarbamoylase? *J. Biol. Chem.* 263: 18583–18586.
Neurath, H. 1989. Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem. Sci.* 14:268–271.
Bode, W., and Huber, R. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* 204:433–451.

Aspartato Transcarbamilase e Interações Alostéricas

Rabinowitz, J. D., Hsiao, J. J., Gryncel, K. R., Kantrowitz, E. R., Feng, X.-J., Li, G., and Rabitz H. 2008. Dissecting enzyme regulation by multiple allosteric effectors: Nucleotide regulation of aspartate transcarbamoylase. *Biochemistry* 47:5881–5888.
West, J. M., Tsuruta, H., and Kantrowitz, E. R. 2004. A fluorescent probe-labeled *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase that monitors the allosteric conformation state. *J. Biol. Chem.* 279:945–951.
Endrizzi, J. A., Beernink, P. T., Alber, T., and Schachman, H. K. 2000. Binding of bisubstrate analog promotes large structural changes in

the unregulated catalytic trimer of aspartate transcarbamoylase: Implications for allosteric regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:5077–5082.

Beernink, P. T., Endrizzi, J. A., Alber, T., and Schachman, H. K. 1999. Assessment of the allosteric mechanism of aspartate transcarbamoylase based on the crystalline structure of the unregulated catalytic subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:5388–5393.

Wales, M. E., Madison, L. L., Glaser, S. S., and Wild, J. R. 1999. Divergent allosteric patterns verify the regulatory paradigm for aspartate transcarbamoylase. *J. Mol. Biol.* 294:1387–1400.

Eisenstein, E., Markby, D. W., and Schachman, H. K. 1990. Heterotropic effectors promote a global conformational change in aspartate transcarbamoylase. *Biochemistry* 29:3724–3731.

Newell, J. O., Markby, D. W., and Schachman, H. K. 1989. Cooperative binding of the bisubstrate analog *N*-(phosphonacetyl)-L-aspartate to aspartate transcarbamoylase and the heterotropic effects of ATP and CTP. *J. Biol. Chem.* 264:2476–2481.

Stevens, R. C., Reinisch, K. M., and Lipscomb, W. N. 1991. Molecular structure of *Bacillus subtilis* aspartate transcarbamoylase at 3.0 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:6087–6091.

Stevens, R. C., Gouaux, J. E., and Lipscomb, W. N. 1990. Structural consequences of effector binding to the T state of aspartate carbamoyltransferase: Crystal structures of the unligated and ATP- and CTP-complexed enzymes at 2.6-Å resolution. *Biochemistry* 29:7691–7701.

Gouaux, J. E., and Lipscomb, W. N. 1990. Crystal structures of phosphonoacetamide ligated T and phosphonoacetamide and malonate ligated R states of aspartate carbamoyltransferase at 2.8-Å resolution and neutral pH. *Biochemistry* 29:389–402.

Labedan, B., Boyen, A., Baetens, M., Charlier, D., Chen, P., Cunin, R., Durbeco, V., Glansdorff, N., Herve, G., Legrain, C., Liang, Z., Purcarea, C., Roovers, M., Sanchez, R., Toong, T. L., Van de Casteele, M., van Vliet, F., Xu, Y., and Zhang, Y. F. 1999. The evolutionary history of carbamoyltransferases: A complex set of paralogous genes was already present in the last universal common ancestor. *J. Mol. Evol.* 49:461–473.

Modificação Covalente

Tarrant, M. K., and Cole, P.A. 2009. The chemical biology of protein phosphorylation *Annu. Rev. Biochem.* 78:797–825.

Johnson, L. N., and Barford, D. 1993. The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22:199–232.

Ziegler, M. 2000. New functions of a long-known molecule: Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 267:1550–1564.

Ng, H. H., and Bird, A. 2000. Histone deacetylases: Silencers for hire. *Trends Biochem. Sci.* 25:121–126.

Jacobson, M. K., and Jacobson, E. L. 1999. Discovering new ADP-ribose polymer cycles: Protecting the genome and more. *Trends Biochem. Sci.* 24:415–417.

Barford, D., Das, A. K., and Egloff, M. P. 1998. The structure and mechanism of protein phosphatases: Insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27:133–164.

Proteína Quinase A

Taylor, S. S., Knighton, D. R., Zheng, J., Sowadski, J. M., Gibbs, C. S., and Zoller, M. J. 1993. A template for the protein kinase family. *Trends Biochem. Sci.* 18:84–89.

Gibbs, C. S., Knighton, D. R., Sowadski, J. M., Taylor, S. S., and Zoller, M. J. 1992. Systematic mutational analysis of cAMP-dependent protein kinase identifies unregulated catalytic subunits and defines regions important for the recognition of the regulatory subunit. *J. Biol. Chem.* 267:4806–4814.

Knighton, D. R., Zheng, J. H., TenEyck, L., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S., and Sowadski, J. M. 1991. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253:407–414.

Knighton, D. R., Zheng, J. H., TenEyck, L., Xuong, N. H., Taylor, S. S., and Sowadski, J. M. 1991. Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253:414–420.

Adams, S. R., Harootunian, A. T., Buechler, Y. J., Taylor, S. S., and Tsien, R. Y. 1991. Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* 349:694–697.

Ativação dos Zimogênios

Neurath, H. 1986. The versatility of proteolytic enzymes. *J. Cell. Biochem.* 32:35–49.

Bode, W., and Huber, R. 1986. Crystal structure of pancreatic serine endopeptidases. In *Molecular and Cellular Basis of Digestion* (pp. 213–234), edited by P. Desnuelle, H. Sjostrom, and O. Noren. Elsevier.

James, M. N. 1991. Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219:671–692.

Inibidores da Protease

Carrell, R., and Travis, J. 1985. α_1-Antitrypsin and the serpins: Variation and countervariation. *Trends Biochem. Sci.* 10:20–24.
Carp, H., Miller, F., Hoidal, J. R., and Janoff, A. 1982. Potential mechanism of emphysema: α_1-Proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:2041–2045.
Owen, M. C., Brennan, S. O., Lewis, J. H., and Carrell, R. W. 1983. Mutation of antitrypsin to antithrombin. *New Engl. J. Med.* 309:694–698.
Travis, J., and Salvesen, G. S. 1983. Human plasma proteinase inhibitors. *Annu. Rev. Biochem.* 52:655–709.

Cascata da Coagulação

Furie, B., and Furie, B. C. 2008. Mechanisms of thrombus formation. *New Engl. J. Med.* 359:938–949.
Orfeo, T., Brufatto, N., Nesheim, M. E., Xu, H., Butenas, S., and Mann, K. G. 2004. The factor V activation paradox. *J. Biol. Chem.* 279:19580–19591.
Mann, K. G. 2003. Thrombin formation. *Chest* 124:4S–10S.
Rose, T., and Di Cera, E. 2002. Three-dimensional modeling of thrombin–fibrinogen interaction. *J. Biol. Chem.* 277:18875–18880.
Krem, M. M., and Di Cera, E. 2002. Evolution of cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends Biochem. Sci.* 27: 67–74.
Fuentes-Prior, P., Iwanaga, Y., Huber, R., Pagila, R., Rumennik, G., Seto, M., Morser, J., Light, D. R., and Bode, W. 2000. Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin–thrombomodulin complex. *Nature* 404:518–525.
Lawn, R. M., and Vehar, G. A. 1986. The molecular genetics of hemophilia. *Sci. Am.* 254(3):48–65.
Brown, J. H., Volkmann, N., Jun, G., Henschen-Edman, A. H., and Cohen, C. 2000. The crystal structure of modified bovine fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:85–90.
Stubbs, M. T., Oschkinat, H., Mayr, I., Huber, R., Angliker, H., Stone, S. R., and Bode,W. 1992. The interaction of thrombin with fibrinogen: A structural basis for its specificity. *Eur. J. Biochem.* 206:187–195.

Capítulo 11

Literatura Básica

Glycochemistry and glycobiology. A series of review articles. 2007. *Nature* 446:999–1051.
Maeder, T. 2002. Sweet medicines. *Sci. Am.* 287(1):40–47.
Sharon, N., and Lis, H. 1993. Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Am.* 268(1):82–89.
Lasky, L. A. 1992. Selectins: Interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 258:964–969.
Woods, R. J. 1995. Three-dimensional structures of oligosaccharides. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:591–598.

Livros

Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Stanley, P., Bertozzi, C., Hart, G., and Etzler, M. E. 2009. *Essentials of Glycobiology,* 2d ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Stick, R. V., and Williams, S. 2008. *Carbohydrates: The Essential Molecules of Life,* 2d ed. Elsevier Science.
Sansome, C., and Markman, O. 2007. *Glycobiology.* Scion.
Lindhorst, T. K. 2007. *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry,* 3d ed. Wiley-VCH.
Taylor, M. E. 2006. *Introduction to Glycobiology,* 2d ed. Oxford University Press.

Proteínas de Ligação de Carboidratos e Glicoproteínas

Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J., and Withers, S. G. 2008. Glycosyltransferases: Structures, functions and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 77:521–555.
Foley, R. N. 2008. Erythropoietin: Physiology and molecular mechanisms. *Heart Failure Rev.* 13:404–414.
Yan, A., and Lennarz, W. J. 2005. Unraveling the mechanism of protein *N*-glycosylation. *J. Biol. Chem.* 280:3121–3124.
Qasba, P. K., Ramakrishnan, B., and Boeggeman, E. 2005. Substrateinduced conformational changes in glycosyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* 30:53–62.
Pratta, M. A., Yao, W., Decicco, C., Tortorella, M., Liu, R.-Q., Copeland, R. A., Magolda, R., Newton, R. C., Trzaskos, J. M., and Arner, E. C. 2003. Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J. Biol. Chem.* 278:45539–45545.
Fisher, J. W. 2003. Erythropoietin: Physiology and pharmacology update. *Exp. Biol. Med.* 228:1–14.
Cheetham, J. C., Smith, D. M., Aoki, K. H., Stevenson, J. L., Hoeffel, T. J., Syed, R. S., Egrie, J., and Harvey, T. S. 1998. NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. *Nat. Struct. Biol.* 5:861–866.
Bouckaert, J., Hamelryck, T., Wyns, L., and Loris, R. 1999. Novel structures of plant lectins and their complexes with carbohydrates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:572–577.

Weis, W. I., and Drickamer, K. 1996. Structural basis of lectin–carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 65:441–473.
Vyas, N. K. 1991. Atomic features of protein–carbohydrate interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1:732–740.
Weis, W. I., Drickamer, K., and Hendrickson, W. A. 1992. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* 360:127–134.
Shaanan, B., Lis, H., and Sharon, N. 1991. Structure of a legume lectin with an ordered *N*-linked carbohydrate in complex with lactose. *Science* 254:862–866.

Glicoproteínas

Hattrup, C. L., and Gendler, S. J. 2008. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu. Rev. Physiol.* 70:431–457.
Thorton, D. J., Rousseau, K., and McGuckin, M. A. 2008. Structure and function of mucins in airways mucus. *Annu. Rev. Physiol.* 70:459–486.
Rose, M. C., and Voynow, J. A. 2007. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol. Rev.* 86:245–278.
Lamoureux, F., Baud'huin, M., Duplomb, L., Heymann, D., and Rédini, F. 2007. Proteoglycans: Key partners in bone cell biology. *Bioessays* 29:758–771.
Carraway, K. L., Funes, M., Workman, H. C., and Sweeney, C. 2007. Contribution of membrane mucins to tumor progression through modulation of cellular growth signaling pathways. *Curr. Top. Dev. Biol.* 78:1–22.
Bernfield, M., Götte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., and Zako, M. 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* 68:729–777.
Iozzo, R. V. 1998. Matrix proteoglycans: From molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 67:609–652.
Yanagishita, M., and Hascall, V. C. 1992. Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 267:9451–9454.
Iozzo, R. V. 1999. The biology of small leucine-rich proteoglycans: Functional network of interactive proteins. *J. Biol. Chem.* 274: 18843–18846.

Carboidratos nos Processos de Reconhecimento

Wasserman, P. M. 2008. Zona pellucida glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 283:24285–24289.
Sharon, N. 2008. Lectins: Past, present and future. *Biochem. Soc. Trans.* 36:1457–1460.
Balzarini, J, 2007. Targeting the glycans of glycoproteins: A novel paradigm for antiviral therapy. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:583–597.
Sharon, N. 2007. Lectins: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J. Biol. Chem.* 282:2753–2764.
Stevens, J., Blixt, O., Tumpey, T. M., Taubenberger, J. K., Paulson, J. C., and Wilson, I. A. 2006. Structure and receptor specificity of hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 312: 404–409.
Cambi, A., Koopman, M., and Figdor, C. G. 2005. How C-type lectins detect pathogens. *Cell. Microbiol.* 7:481–488.
Turner, M. L. 1992. Cell adhesion molecules: A unifying approach to topographic biology. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 67:359–377.
Feizi, T. 1992. Blood group–related oligosaccharides are ligands in celladhesion events. *Biochem. Soc. Trans.* 20:274–278.
Jessell, T. M., Hynes, M. A., and Dodd, J. 1990. Carbohydrates and carbohydrate-binding proteins in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 13:227–255.
Clothia, C., and Jones, E. V. 1997. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 66:823–862.

Sequenciamento de Carboidratos

Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R., and Sasisekharan, R. 1999. Sequencing complex polysaccharides. *Science* 286:537–542.
Zhao, Y., Kent, S. B. H., and Chait, B. T. 1997. Rapid, sensitive structure analysis of oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:1629–1633.
Rudd, P. M., Guile, G. R., Küster, B., Harvey, D. J., Opdenakker, G., and Dwek, R. A. 1997. Oligosaccharide sequencing technology. *Nature* 388:205–207.

Capítulo 12

Literatura Básica

De Weer, P. 2000. A century of thinking about cell membranes. *Annu. Rev. Physiol.* 62:919–926.
Bretscher, M. S. 1985. The molecules of the cell membrane. *Sci. Am.* 253(4):100–108.
Unwin, N., and Henderson, R. 1984. The structure of proteins in biological membranes. *Sci. Am.* 250(2):78–94.
Deisenhofer, J., and Michel, H. 1989. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodopseudomonas viridis*. *EMBO J.* 8:2149–2170.
Singer, S. J., and Nicolson, G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720–731.
Jacobson, K., Sheets, E. D., and Simson, R., 1995. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* 268:1441–1442.

Livros

Gennis, R. B. 1989. *Biomembranes: Molecular Structure and Function.* Springer Verlag.

Vance, D. E., and Vance, J. E. (Eds.). 1996. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes.* Elsevier.

Lipowsky, R., and Sackmann, E. 1995. *The Structure and Dynamics of Membranes.* Elsevier.

Racker, E. 1985. *Reconstitutions of Transporters, Receptors, and Pathological States.* Academic Press.

Tanford, C. 1980. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes* (2d ed.). Wiley-Interscience.

Lipídios da Membrana e Estrutura Dinâmica

Lingwood, D., and Simons, K. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science.* 327:46–50.

Pike, L. J. 2009. The challenge of lipid rafts. *J. Lipid Res.* 50:S323– S328.

Simons, K., and Vaz, W. L. 2004. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33:269–295.

Anderson, T. G., and McConnell, H. M. 2002. A thermodynamic model for extended complexes of cholesterol and phospholipid. *Biophys. J.* 83:2039–2052.

Saxton, M. J., and Jacobson, K. 1997. Single-particle tracking: Applications to membrane dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:373–399.

Bloom, M., Evans, E., and Mouritsen, O. G. 1991. Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: A perspective. *Q. Rev. Biophys.* 24:293–397.

Elson, E. L. 1986. Membrane dynamics studied by fluorescence correlation spectroscopy and photobleaching recovery. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 40:367–383.

Zachowski, A., and Devaux, P. F. 1990. Transmembrane movements of lipids. *Experientia* 46:644–656.

Devaux, P. F. 1992. Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21:417–439.

Silvius, J. R. 1992. Solubilization and functional reconstitution of biomembrane components. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21:323–348.

Yeagle, P. L., Albert, A. D., Boesze-Battaglia, K., Young, J., and Frye, J. 1990. Cholesterol dynamics in membranes. *Biophys. J.* 57:413–424.

Nagle, J. F., and Tristram-Nagle, S. 2000. Lipid bilayer structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:474–480.

Dowhan, W. 1997. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* 66:199–232.

Huijbregts, R. P. H., de Kroon, A. I. P. M., and de Kruijff, B. 1998. Rapid transmembrane movement of newly synthesized phosphatidylethanolamine across the inner membrane of *Escherichia coli. J. Biol. Chem.* 273:18936–18942.

Estrutura das Proteínas de Membrana

Walian, P., Cross, T. A., and Jap, B. K. 2004. Structural genomics of membrane proteins. *Genome Biol.* 5:215.

Werten, P. J., Remigy, H. W., de Groot, B. L., Fotiadis, D., Philippsen, A., Stahlberg, H., Grubmuller, H., and Engel, A. 2002. Progress in the analysis of membrane protein structure and function. *FEBS Lett.* 529:65–72.

Popot, J.-L., and Engleman, D. M. 2000. Helical membrane protein folding, stability and evolution. *Annu. Rev. Biochem.* 69:881–922.

White, S. H., and Wimley, W. C. 1999. Membrane protein folding and stability: Physical principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28:319–365.

Marassi, F. M., and Opella, S. J. 1998. NMR structural studies of membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:640–648.

Lipowsky, R. 1991. The conformation of membranes. *Nature* 349:475– 481.

Altenbach, C., Marti, T., Khorana, H. G., and Hubbell, W. L. 1990. Transmembrane protein structure: Spin labeling of bacteriorhodopsin mutants. *Science* 248:1088–1092.

Fasman, G. D., and Gilbert, W. A. 1990. The prediction of transmembrane protein sequences and their conformation: An evaluation. *Trends Biochem. Sci.* 15:89–92.

Jennings, M. L. 1989. Topography of membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58:999–1027.

Engelman, D. M., Steitz, T. A., and Goldman, A. 1986. Identifying non-polar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15:321–353.

Udenfriend, S., and Kodukola, K. 1995. How glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.* 64:563–591.

Membranas Intracelulares

Skehel, J. J., and Wiley, D. C. 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 69:531–569.

Roth, M. G. 1999. Lipid regulators of membrane traffic through the Golgi complex. *Trends Cell Biol.* 9:174–179.

Jahn, R., and Sudhof, T. C. 1999. Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68:863–911.

Stroud, R. M., and Walter, P. 1999. Signal sequence recognition and protein targeting. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:754–759.
Teter, S. A., and Klionsky, D. J. 1999. How to get a folded protein across a membrane. *Trends Cell Biol.* 9:428–431.
Hettema, E. H., Distel, B., and Tabak, H. F. 1999. Import of proteins into peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1451:17–34.

Fusão da Membrana

Sollner, T. H., and Rothman, J. E. 1996. Molecular machinery mediating vesicle budding, docking and fusion. *Experientia* 52:1021–1025.
Ungar, D., and Hughson, F. M. 2003. SNARE protein structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19:493–517.

Capítulo 13

Literatura Básica

Lancaster, C. R. 2004. Structural biology: Ion pump in the movies. *Nature* 432:286–287.
Unwin, N. 2003. Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett.* 555:91–95.
Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Iwata, S., and Kaback, H. R. 2003. The lactose permease of *Escherichia coli:* Overall structure, the sugar-binding site and the alternating access model for transport. *FEBS Lett.* 555:96–101.
Lienhard, G. E., Slot, J. W., James, D. E., and Mueckler, M. M. 1992. How cells absorb glucose. *Sci. Am.* 266(1):86–91.
King, L. S., Kozono, D., and Agre, P. 2004. From structure to disease: The evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:687–698.
Neher, E., and Sakmann, B. 1992. The patch clamp technique. *Sci. Am.* 266(3):28–35.
Sakmann, B. 1992. Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *Science* 256:503–512.

Livros

Ashcroft, F. M. 2000. *Ion Channels and Disease.* Academic Press.
Conn, P. M. (Ed.). 1998. *Ion Channels,* vol. 293, *Methods in Enzymology.* Academic Press.
Aidley, D. J., and Stanfield, P. R. 1996. *Ion Channels: Molecules in Action.* Cambridge University Press.
Hille, B. 2001. *Ionic Channels of Excitable Membranes* (3d ed.). Sinauer.
Läuger, P. 1991. *Electrogenic Ion Pumps.* Sinauer.
Stein, W. D. 1990. *Channels, Carriers, and Pumps: An Introduction to Membrane Transport.* Academic Press.
Hodgkin, A. 1992. *Chance and Design: Reminiscences of Science in Peace and War.* Cambridge University Press.

ATPases do Tipo P

Sorensen, T. L., Moller, J. V., and Nissen, P. 2004. Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* 304:1672–1675.
Sweadner, K. J., and Donnet, C. 2001. Structural similarities of Na, KATPase and SERCA, the Ca^{2+}-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 356:685–704.
Toyoshima, C., and Mizutani, T. 2004. Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* 430:529–535.
Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405:647–655.
Auer, M., Scarborough, G. A., and Kuhlbrandt, W. 1998. Threedimensional map of the plasma membrane H^1-ATPase in the open conformation. Nature 392:840–843.
Axelsen, K. B., and Palmgren, M. G. 1998. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* 46:84–101.
Pedersen, P. A., Jorgensen, J. R., and Jorgensen, P. L. 2000. Importance of conserved a-subunit segment ^{709}GDGVND for Mg^{2+} binding, phosphorylation, energy transduction in Na, K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 275:37588–37595.
Blanco, G., and Mercer, R. W. 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.* 275:F633–F650.
Estes, J. W., and White, P. D. 1965. William Withering and the purple foxglove. Sci. Am. 212(6):110–117.

Cassete de Ligação de ATP

Ward, A., Reyes, C. L., Yu, J., Roth, C. B., and Chang, G. 2007. Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:19005–19010.
Locher, K. P. 2004. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14:426–431.
Locher, K. P., Lee, A. T., and Rees, D. C. 2002. The *E. coli* BtuCD structure: A framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296:1091–1098.
Borths, E. L., Locher, K. P., Lee, A. T., and Rees, D. C. 2002. The structure of *Escherichia coli* BtuF and binding to its cognate ATP

binding cassette transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:16642–16647.
Dong, J., Yang, G., and McHaourab, H. S. 2005. Structural basis of energy transduction in the transport cycle of MsbA. *Science* 308:1023–1028.
Akabas, M. H. 2000. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: Structure and function of an epithelial chloride channel. *J. Biol. Chem.* 275:3729–3732.
Chen, J., Sharma, S., Quiocho, F. A., and Davidson, A. L. 2001. Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: Evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:1525–1530.
Sheppard, D. N., and Welsh, M. J. 1999. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* 79:S23–S45.
Jones, P. M., and George, A. M. 2000. Symmetry and structure in P-glycoprotein and ABC transporters: What goes around comes around. *Eur. J. Biochem.* 287:5298–5305.
Chen, Y., and Simon, S. M. 2000. In situ biochemical demonstration that P-glycoprotein is a drug efflux pump with broad specificity. *J. Cell Biol.* 148:863–870.
Saier, M. H., Jr., Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., Pao, S. S., Skurray, R. A., and Nikaido, H. 1998. Evolutionary origins of multidrug and drugspecific efflux pumps in bacteria. *FASEB J.* 12:265–274.

Simportadores e Antiportadores

Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R., and Iwata, S. 2003. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli. Science* 301:610–615.
Philipson, K. D., and Nicoll, D. A. 2000. Sodium-calcium exchange: A molecular perspective. *Annu. Rev. Physiol.* 62:111–133.
Pao, S. S., Paulsen, I. T., and Saier, M. H., Jr. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1–34.
Wright, E. M., Hirsch, J. R., Loo, D. D., and Zampighi, G. A. 1997. Regulation of Na^+/glucose cotransporters. *J. Exp. Biol.* 200:287–293.
Kaback, H. R., Bibi, E., and Roepe, P. D. 1990. b-Galactoside transport in *E. coli:* A functional dissection of lac permease. *Trends Biochem. Sci.* 8:309–314.
Hilgemann, D. W., Nicoll, D. A., and Philipson, K. D. 1991. Charge movement during Na^+ translocation by native and cloned cardiac Na^+/Ca^{2+} exchanger. *Nature* 352:715–718.
Hediger, M. A., Turk, E., and Wright, E. M. 1989. Homology of the human intestinal Na^+/glucose and *Escherichia coli* Na^+/proline cotransporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:5748–5752.

Canais Iônicos

Zhou, Y., and MacKinnon, R. 2003. The occupancy of ions in the K^+ selectivity filter: Charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J. Mol. Biol.* 333:965–975.
Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., and MacKinnon, R. 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K^+ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414:43–48.
Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. 2002. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417:523–526.
Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. 2003. X-ray structure of a voltage-dependent K^+ channel. *Nature* 423:33–41.
Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., and MacKinnon, R. 2003. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K^+ channel. *Nature* 423:42–48.
Mackinnon, R. 2004. Structural biology: Voltage sensor meets lipid membrane. *Science* 306:1304–1305.
Bezanilla, F. 2000. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* 80:555–592.
Shieh, C.-C., Coghlan, M., Sullivan, J. P., and Gopalakrishnan, M. 2000. Potassium channels: Molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol. Rev.* 52:557–594.
Horn, R. 2000. Conversation between voltage sensors and gates of ion channels. *Biochemistry* 39:15653–15658.
Perozo, E., Cortes, D. M., and Cuello, L. G. 1999. Structural rearrangements underlying K^+-channel activation gating. *Science* 285:73–78.
Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon R. 1998. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science* 280:69–77.
Marban, E., Yamagishi, T., and Tomaselli, G. F. 1998. Structure and function of the voltage-gated Na^+ channel. *J. Physiol.* 508:647–657.
Miller, R. J. 1992. Voltage-sensitive Ca^{2+} channels. *J. Biol. Chem.* 267:1403–1406.
Catterall, W. A. 1991. Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: A tale of two calcium channels. *Cell* 64:871–874.

Canais Iônicos Regulados por Ligantes

Unwin, N. 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 346:967–989.

Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Stowell, M., and Unwin, N. 1999. Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: Transverse tunnels in the channel wall. *J. Mol. Biol.* 288:765–786.
Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. 2002. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417:515–522.
Barrantes, F. J., Antollini, S. S., Blanton, M. P., and Prieto, M. 2000. Topography of the nicotinic acetylcholine receptor membraneembedded domains. *J. Biol. Chem.* 275:37333–37339.
Cordero-Erausquin, M., Marubio, L. M., Klink, R., and Changeux, J. P. 2000. Nicotinic receptor function: New perspectives from knockout mice. *Trends Pharmacol. Sci.* 21:211–217.
Le Novère, N., and Changeux, J. P. 1995. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: An example of multigene family in excitable cells. *J. Mol. Evol.* 40:155–172.
Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., and Morikawa, K. 2000. Structural basis of glutamate recognition by dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407:971–978.
Betz, H., Kuhse, J., Schmieden, V., Laube, B., Kirsch, J., and Harvey, R. J. 1999. Structure and functions of inhibitory and excitatory glycine receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868:667–676.
Unwin, N. 1995. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* 373:37–43.
Colquhoun, D., and Sakmann, B. 1981. Fluctuations in the microsecond time range of the current through single acetylcholine receptor ion channels. *Nature* 294:464–466.

Síndrome do QT Longo e hERG

Saenen, J. B., and Vrints, C. J. 2008. Molecular aspects of the congenital and acquired Long QT Syndrome: clinical implications. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44:633–646.
Zaręba, W. 2007. Drug induced QT prolongation. *Cardiol. J.* 14:523–533.
Fernandez, D., Ghanta, A., Kauffman, G. W., and Sanguinetti, M. C. 2004. Physicochemical features of the hERG channel drug binding site. *J. Biol. Chem.* 279:10120–10127.
Mitcheson, J. S., Chen, J., Lin, M., Culberson, C., and Sanguinetti, M. C. 2000. A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:12329–12333.

Junções Comunicantes *(gap junctions)*

Saez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martinez, A. D., and Beyer, E. C. 2003. Plasma membrane channels formed by connexins: Their regulation and functions. *Physiol. Rev.* 83:1359–1400.
Revilla, A., Bennett, M. V. L., and Barrio, L. C. 2000. Molecular determinants of membrane potential dependence in vertebrate gap junction channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:14760–14765.
Unger, V. M., Kumar, N. M., Gilula, N. B., and Yeager, M. 1999. Threedimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 283:1176–1180.
Simon, A. M. 1999. Gap junctions: More roles and new structural data. *Trends Cell Biol.* 9:169–170.
Beltramello, M., Piazza, V., Bukauskas, F. F., Pozzan, T., and Mammano, F. 2005. Impaired permeability to Ins(1,4,5)P_3 in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness. *Nat. Cell Biol.* 7:63–69.
White, T. W., and Paul, D. L. 1999. Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. *Annu. Rev. Physiol.* 61:283–310.

Canal de Água

Agre, P., King, L. S., Yasui, M., Guggino, W. B., Ottersen, O. P., Fujiyoshi, Y., Engel, A., and Nielsen, S. 2002. Aquaporin water channels: From atomic structure to clinical medicine. *J. Physiol.* 542:3–16.
Agre, P., and Kozono, D. 2003. Aquaporin water channels: Molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett.* 555:72–78.
de Groot, B. L., Engel, A., and Grubmuller, H. 2003. The structure of the aquaporin-1 water channel: A comparison between cryoelectron microscopy and X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.* 325:485–493.

Capítulo 14

Literatura Básica

Scott, J. D., and Pawson, T. 2000. Cell communication: The inside story. *Sci. Am.* 282(6):7279.
Pawson, T. 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature* 373:573–580.
Okada, T., Ernst, O. P., Palczewski, K., and Hofmann, K. P. 2001. Activation of rhodopsin: New insights from structural and biochemical studies. *Trends Biochem. Sci.* 26:318–324.
Tsien, R. Y. 1992. Intracellular signal transduction in four dimensions: From molecular design to physiology. *Am. J. Physiol.* 263:C723–

C728.
Loewenstein, W. R. 1999. *Touchstone of Life: Molecular Information, Cell Communication, and the Foundations of Life.* Oxford University Press.

Proteínas G e Receptores 7TM

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., and Miyano, M. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289:739–745.
Rasmussen, S. G. F., Choi, H.-J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R. P., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F. X., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. 2007. Crystal structure of the human β_2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450:383–387.
Rosenbaum, D. M., Cherezov, V., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G. F., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H.-J., Yao, X.-J., Weis, W. I., Stevens, R. C., and Kobilka, B. K. 2007. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into β_2-adrenergic receptor function. *Science* 318:1266–1273.
Lefkowitz, R. J. 2000. The superfamily of heptahelical receptors. *Nat. Cell Biol.* 2:E133–E136.
Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F. 1991. The GTPase superfamily: Conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349:117–127.
Lambright, D. G., Noel, J. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. 1994. Structural determinants for activation of the α-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* 369:621–628.
Noel, J. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. 1993. The 2.2 Å crystal structure of transducin-α complexed with GTPγS. *Nature* 366:654–663.
Sondek, J., Lambright, D. G., Noel, J. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. 1994. GTPase mechanism of G proteins from the 1.7-Å crystal structure of transducin α-GDP-AIF^-_4. *Nature* 372:276–279.
Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D. G., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. 1996. Crystal structure of a G-protein βγ dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* 379:369–374.
Wedegaertner, P. B., Wilson, P. T., and Bourne, H. R. 1995. Lipid modifications of trimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* 270:503–506.
Farfel, Z., Bourne, H. R., and Iiri, T. 1999. The expanding spectrum of G protein diseases. *N. Engl. J. Med.* 340:1012–1020.
Bockaert, J., and Pin, J. P. 1999. Molecular tinkering of G proteincoupled receptors: An evolutionary success. *EMBO J.* 18:1723–1729.

Cascata do AMP Cíclico

Hurley, J. H. 1999. Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 274:7599–7602.
Kim, C., Xuong, N. H., and Taylor, S. S. 2005. Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RI) subunits of PKA. *Science* 307:690–696.
Tesmer, J. J., Sunahara, R. K., Gilman, A. G., and Sprang, S. R. 1997. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with $G_{s\alpha}$-GTPγS. *Science* 278:1907–1916.
Smith, C. M., Radzio-Andzelm, E., Madhusudan, Akamine, P., and Taylor, S. S. 1999. The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: Prototype for an extended network of communication. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71:313–341.
Taylor, S. S., Buechler, J. A., and Yonemoto, W. 1990. cAMP-dependent protein kinase: Framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 59:971–1005.

Cascata de Fosfoinositídio

Berridge, M. J., and Irvine, R. F. 1989. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341:197–205.
Berridge, M. J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315–325.
Essen, L. O., Perisic, O., Cheung, R., Katan, M., and Williams, R. L. 1996. Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C δ. *Nature* 380:595–602.
Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J., and Sigler, P. B. 1995. Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* 83:1037–1046.
Baraldi, E., Carugo, K. D., Hyvonen, M., Surdo, P. L., Riley, A. M., Potter, B. V., O'Brien, R., Ladbury, J. E., and Saraste, M. 1999. Structure of the PH domain from Bruton's tyrosine kinase in complex with inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate. *Struct. Fold. Design* 7:449–460.

Cálcio

Ikura, M., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Zhu, G., Klee, C. B., and Bax, A. 1992. Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science* 256:632–638.
Kuboniwa, H., Tjandra, N., Grzesiek, S., Ren, H., Klee, C. B., and Bax, A. 1995. Solution structure of calcium-free calmodulin. *Nat. Struct. Biol.* 2:768–776.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260:3440–3450.

Kerr, R., Lev-Ram, V., Baird, G., Vincent, P., Tsien, R. Y., and Schafer, W. R. 2000. Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron* 26:583–594.

Chin, D., and Means, A. R. 2000. Calmodulin: A prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* 10:322–328.

Dawson, A. P. 1997. Calcium signalling: How do IP_3 receptors work? *Curr. Biol.* 7:R544–R547.

Proteína Quinases, Incluindo Receptores de Tirosina Quinases

Riedel, H., Dull, T. J., Honegger, A. M., Schlessinger, J., and Ullrich, A. 1989. Cytoplasmic domains determine signal specificity, cellular routing characteristics and influence ligand binding of epidermal growth factor and insulin receptors. *EMBO J.* 8:2943–2954.

Taylor, S. S., Knighton, D. R., Zheng, J., Sowadski, J. M., Gibbs, C. S., and Zoller, M. J. 1993. A template for the protein kinase family. *Trends Biochem. Sci.* 18:84–89.

Sicheri, F., Moarefi, I., and Kuriyan, J. 1997. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385:602–609.

Waksman, G., Shoelson, S. E., Pant, N., Cowburn, D., and Kuriyan, J. 1993. Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: Crystal structures of the complexed and peptidefree forms. *Cell* 72:779–790.

Schlessinger, J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211–225.

Simon, M. A. 2000. Receptor tyrosine kinases: Specific outcomes from general signals. *Cell* 103:13–15.

Robinson, D. R., Wu, Y. M., and Lin, S. F. 2000. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19:5548–5557.

Hubbard, S. R. 1999. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71:343–358.

Carter-Su, C., and Smit, L. S. 1998. Signaling via JAK tyrosine kinases: Growth hormone receptor as a model system. *Recent Prog. Horm. Res.* 53:61–82.

Via de Sinalização da Insulina

Khan, A. H., and Pessin, J. E. 2002. Insulin regulation of glucose uptake: A complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* 45:1475–1483.

Bevan, P. 2001. Insulin signalling. *J. Cell Sci.* 114:1429–1430.

De Meyts, P., and Whittaker, J. 2002. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: Implications for drug design. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1:769–783.

Dhe-Paganon, S., Ottinger, E. A., Nolte, R. T., Eck, M. J., and Shoelson, S. E. 1999. Crystal structure of the pleckstrin homology-phosphotyrosine binding (PH-PTB) targeting region of insulin receptor substrate 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:8378–8383.

Domin, J., and Waterfield, M. D. 1997. Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *FEBS Lett.* 410:91–95.

Hubbard, S. R. 1997. Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J.* 16:5572–5581.

Hubbard, S. R., Wei, L., Ellis, L., and Hendrickson, W. A. 1994. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 372:746–754.

Via de Sinalização do EGF

Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. X., Ward, C. W., and Yokoyama, S. 2003. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol. Cell* 12:541–552.

Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney, D. W., Jr., and Leahy, D. J. 2003. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421:756–760.

Chong, H., Vikis, H. G., and Guan, K. L. 2003. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell. Signal.* 15:463–469.

Stamos, J., Sliwkowski, M. X., and Eigenbrot, C. 2002. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J. Biol. Chem.* 277:46265–46272.

Ras

Milburn, M. V., Tong, L., deVos, A. M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., and Kim, S. H. 1990. Molecular switch for signal transduction: Structural differences between active and inactive forms of protooncogenic Ras proteins. *Science* 247:939–945.

Boriack-Sjodin, P. A., Margarit, S. M., Bar-Sagi, D., and Kuriyan, J. 1998. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* 394:337–343.

Maignan, S., Guilloteau, J. P., Fromage, N., Arnoux, B., Becquart, J., and Ducruix, A. 1995. Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor. *Science* 268:291–293.

Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* 81:153–208.

Câncer

Druker, B. J., Sawyers, C. L., Kantarjian, H., Resta, D. J., Reese, S. F., Ford, J. M., Capdeville, R., and Talpaz, M. 2001. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N. Engl. J. Med.* 344:1038–1042.
Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9:138–141.
Ellis, C. A., and Clark, G. 2000. The importance of being K-Ras. *Cell. Signal.* 12:425–434.
Hanahan, D., and Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70.
McCormick, F. 1999. Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol.* 9:M53–M56.

Capítulo 15

Literatura Básica

Stipanuk, M. H. (Ed.). 2006. *Biochemical, Physiological, Molecular Aspects of Human Nutrition.* Saunders-Elsevier.
McGrane, M. M., Yun, J. S., Patel, Y. M., and Hanson, R. W. 1992. Metabolic control of gene expression: In vivo studies with transgenic mice. *Trends Biochem. Sci.* 17:40–44.
Westheimer, F. H. 1987. Why nature chose phosphates. *Science* 235:1173–1178.

Livros

Atkins, P., and de Paula, J. 2005. *Physical Chemistry for the Life Sciences.* W. H. Freeman and Company.
Harold, F. M. 1986. *The Vital Force: A Study of Bioenergetics.* W. H. Freeman and Company.
Krebs, H. A., and Kornberg, H. L. 1957. *Energy Transformations in Living Matter.* Springer Verlag.
Nicholls, D. G., and Ferguson, S. J. 2002. *Bioenergetics 3* (3d ed.). Academic Press.
Frayn, K. N. 2010. *Metabolic Regulation: A Human Perspective* (3d ed.). Wiley-Blackwell.
Fell, D. 1997. *Understanding the Control of Metabolism.* Portland Press.
Harris, D. A. 1995. *Bioenergetics at a Glance.* Blackwell Scientific.
Von Baeyer, H. C. 1999. *Warmth Disperses and Time Passes: A History of Heat.* Modern Library.

Termodinâmica

Alberty, R. A. 1993. Levels of thermodynamic treatment of biochemical reaction systems. *Biophys. J.* 65:1243–1254.
Alberty, R. A., and Goldberg, R. N. 1992. Standard thermodynamic formation properties for the adenosine 5'-triphosphate series. *Biochemistry* 31:10610–10615.
Alberty, R. A. 1968. Effect of pH and metal ion concentration on the equilibrium hydrolysis of adenosine triphosphate to adenosine diphosphate. *J. Biol. Chem.* 243:1337–1343.
Goldberg, R. N. 1984. *Compiled Thermodynamic Data Sources for Aqueous and Biochemical Systems: An Annotated Bibliography (1930–1983).* National Bureau of Standards Special Publication 685, U.S. Government Printing Office.
Frey, P. A., and Arabshahi, A. 1995. Standard free energy change for the hydrolysis of the α,β-phosphoanhydride bridge in ATP. *Biochemistry* 34:11307–11310.

Bioenergética e Metabolismo

Schilling, C. H., Letscher, D., and Palsson, B. O. 2000. Theory for the systemic definition of metabolic pathways and their use in interpreting metabolic function from a pathway-oriented perspective. *J. Theor. Biol.* 203:229–248.
DeCoursey, T. E., and Cherny, V. V. 2000. Common themes and problems of bioenergetics and voltage-gated proton channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1458:104–119.
Giersch, C. 2000. Mathematical modelling of metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:249–253.
Rees, D. C., and Howard, J. B. 1999. Structural bioenergetics and energy transduction mechanisms. *J. Mol. Biol.* 293:343–350.

Regulação do Metabolismo

Kemp, G. J. 2000. Studying metabolic regulation in human muscle. *Biochem. Soc. Trans.* 28:100–103.
Towle, H. C., Kaytor, E. N., and Shih, H. M. 1996. Metabolic regulation of hepatic gene expression. *Biochem. Soc. Trans.* 24:364–368.
Hofmeyr, J. H. 1995. Metabolic regulation: A control analytic perspective. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27:479–490.

Aspectos Históricos

Kalckar, H. M. 1991. 50 years of biological research: From oxidative phosphorylation to energy requiring transport regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 60:1–37.
Kalckar, H. M. (Ed.). 1969. *Biological Phosphorylations.* Prentice Hall.

Fruton, J. S. 1972. *Molecules and Life.* Wiley-Interscience.
Lipmann, F. 1971. *Wanderings of a Biochemist.* Wiley-Interscience.

Capítulo 16

Literatura Básica

Knowles, J. R. 1991. Enzyme catalysis: Not different, just better. *Nature* 350:121–124.
Granner, D., and Pilkis, S. 1990. The genes of hepatic glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 265:10173–10176.
McGrane, M. M., Yun, J. S., Patel, Y. M., and Hanson, R. W. 1992. Metabolic control of gene expression: In vivo studies with transgenic mice. *Trends Biochem. Sci.* 17:40–44.
Pilkis, S. J., and Granner, D. K. 1992. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* 54:885–909.

Livros

Frayn, K. N. 2010. *Metabolic Regulation: A Human Perspective* (3d ed.). Wiley-Blackwell.
Fell, D. 1997. *Understanding the Control of Metabolism.* Portland.
Fersht, A. 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding.* W. H. Freeman and Company.
Poortmans, J. R. (Ed.). 2004. *Principles of Exercise Biochemistry.* Krager.

Estrutura Glicolítica e Enzimas Gliconeogênicas

Ferreras, C., Hernández, E. D., Martínez-Costa, O. H., and Aragón, J. J. 2009. Subunit interactions and composition of the fructose 6-phosphate catalytic site and the fructose 2,6-bisphosphate allosteric site of mammalian phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 284:9124–9131.
Hines, J. K., Chen, X., Nix, J. C., Fromm, H. J., and Honzatko. R. B. 2007. Structures of mammalian and bacterial fructose-1,6-bisphosphatase reveal the basis for synergism in AMP/fructose-2, 6-bisphosphate inhibition. *J. Biol. Chem.* 282:36121–36131.
Ferreira-da-Silva, F., Pereira, P. J., Gales, L., Roessle, M., Svergun, D. I., Moradas-Ferreira, P., and Damas, A. M. 2006. The crystal and solution structures of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reveal different quaternary structures. *J. Biol. Chem.* 281:33433–33440.
Kim, S.-G., Manes, N. P., El-Maghrabi, M. R., and Lee, Y.-H. 2006. Crystal structure of the hypoxia-inducible form of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-phosphatase (PFKFB3): A possible target for cancer therapy. *J. Biol. Chem.* 281:2939–2944.
Aleshin, A. E., Kirby, C., Liu, X., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Fromm, H. J., and Honzatko, R. B. 2000. Crystal structures of mutant monomeric hexokinase I reveal multiple ADP binding sites and conformational changes relevant to allosteric regulation. *J. Mol. Biol.* 296:1001–1015.
Jeffery, C. J., Bahnson, B. J., Chien, W., Ringe, D., and Petsko, G. A. 2000. Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase, a glycolytic enzyme that moonlights as neuroleukin, autocrine motility factor, and differentiation mediator. *Biochemistry* 39:955–964.
Schirmer, T., and Evans, P. R. 1990. Structural basis of the allosteric behaviour of phosphofructokinase. *Nature* 343:140–145.
Cooper, S. J., Leonard, G. A., McSweeney, S. M., Thompson, A. W., Naismith, J. H., Qamar, S., Plater, A., Berry, A., and Hunter, W. N. 1996. The crystal structure of a class II fructose-l,6-bisphosphate aldolase shows a novel binuclear metal-binding active site embedded in a familiar fold. *Structure* 4:1303–1315.
Davenport, R. C., Bash, P. A., Seaton, B. A., Karplus, M., Petsko, G. A., and Ringe, D. 1991. Structure of the triosephosphate isomerase–phosphoglycolohydroxamate complex: An analogue of the intermediate on the reaction pathway. *Biochemistry* 30:5821–5826.
Bernstein, B. E., and Hol, W. G. 1998. Crystal structures of substrates and products bound to the phosphoglycerate kinase active site reveal the catalytic mechanism. *Biochemistry* 37:4429–4436.
Rigden, D. J., Alexeev, D., Phillips, S. E. V., and Fothergill-Gilmore, L. A. 1998. The 2.3 Å X-ray crystal structure of *S. cerevisiae* phosphoglycerate mutase. *J. Mol. Biol.* 276:449–459.
Zhang, E., Brewer, J. M., Minor, W., Carreira, L. A., and Lebioda, L. 1997. Mechanism of enolase: The crystal structure of asymmetric dimer enolase-2-phospho-D-glycerate/enolase-phosphoenolpyruvate at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* 36:12526–12534.
Mattevi, A., Valentini, G., Rizzi, M., Speranza, M. L., Bolognesi, M., and Coda, A. 1995. Crystal structure of *Escherichia coli* pyruvate kinase type I: Molecular basis of the allosteric transition. *Structure* 3:729–741.
Hasemann, C. A., Istvan E. S., Uyeda, K., and Deisenhofer, J. 1996. The crystal structure of the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase reveals distinct domain homologies. *Structure* 4:1017–1029.
Tari, L. W., Matte, A., Pugazhenthi, U., Goldie, H., and Delbaere, L. T. J. 1996. Snapshot of an enzyme reaction intermediate in the structure of the ATP-Mg^{2+}-oxalate ternary complex of *Escherichia coli* PEP carboxykinase. *Nat. Struct. Biol.* 3:355–363.

Mecanismos Catalíticos

Soukri, A., Mougin, A., Corbier, C., Wonacott, A., Branlant, C., and Branlant, G. 1989. Role of the histidine 176 residue in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 28:2586–2592.

Bash, P. A., Field, M. J., Davenport, R. C., Petsko, G. A., Ringe, D., and Karplus, M. 1991. Computer simulation and analysis of the reaction pathway of triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 30:5826–5832.

Knowles, J. R., and Albery, W. J. 1977. Perfection in enzyme catalysis: The energetics of triosephosphate isomerase. *Acc. Chem. Res.* 10:105–111.

Rose, I. A. 1981. Chemistry of proton abstraction by glycolytic enzymes (aldolase, isomerases, and pyruvate kinase). *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 293:131–144.

Regulação

Anderka, O., Boyken, J., Aschenbach, U., Batzer, A., Boscheinen, O., and Schmoll, D. 2008. Biophysical characterization of the interaction between hepatic glucokinase and its regulatory protein: Impact of physiological and pharmacological effectors. *J. Biol. Chem.* 283:31333–31340.

Iancu, C. V., Mukund, S., Fromm, H. J., and Honzatko, R. B. 2005. R-state AMP complex reveals initial steps of the quaternary transition of fructose-l,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 280:19737–19745.

Wilson, J. E. 2003. Isozymes of mammalian hexokinase: Structure, function and subcellular location. *J. Exp. Biol.* 206:2049–2057.

Lee, Y. H., Li, Y., Uyeda, K., and Hasemann, C. A. 2003. Tissuespecific structure/function differentiation of the five isoforms of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 278:523–530.

Depre, C., Rider, M. H., and Hue, L. 1998. Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur. J. Biochem.* 258:277–290.

Harrington, G. N., and Bush, D. R. 2003. The bifunctional role of hexokinase in metabolism and glucose signaling. *Plant Cell* 15:2493–2496.

Gleeson, T. T. 1996. Post-exercise lactate metabolism: A comparative review of sites, pathways, and regulation. *Annu. Rev. Physiol.* 58:556–581.

Nordlie, R. C., Foster, J. D., and Lange, A. J. 1999. Regulation of glucose production by the liver. *Annu. Rev. Nutr.* 19:379–406.

Jitrapakdee, S., and Wallace, J. C. 1999. Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 340:1–16.

Pilkis, S. J., and Claus, T. H. 1991. Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: Regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes. *Annu. Rev. Nutr.* 11:465–515.

Plaxton, W. C. 1996. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:185–214.

van de Werve, G., Lange, A., Newgard, C., Mechin, M. C., Li, Y., and Berteloot, A. 2000. New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. *Eur. J. Biochem.* 267:1533–1549.

Transportadores de Carboidratos

Blodgett, D. M., Graybill, C. and Carruthers, A. 2008. Analysis of glucose transporter topology and structural dynamics. *J. Biol. Chem.* 283:36416–36424.

Huang, S., and Czech, M. P. 2007. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab.* 5:237–252.

Czech, M. P., and Corvera, S. 1999. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol. Chem.* 274:1865–1868.

Silverman, M. 1991. Structure and function of hexose transporters. *Annu. Rev. Biochem.* 60:757–794.

Thorens, B., Charron, M. J., and Lodish, H. F. 1990. Molecular physiology of glucose transporters. *Diabetes Care* 13:209–218.

Glicólise e Câncer

Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., and Thompson, C. B. 2009. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324:1029–1033.

Mathupala, S. P., Ko, Y. H., and Pedersen, P. L. 2009. Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer's stygian link to the "Warburg effect" and a pivotal target for effective therapy. *Sem. Cancer Biol.* 19:17–24.

Kroemer, G. K., and Pouyssegur, J. 2008. Tumor cell metabolism: Cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 12:472–482.

Hsu, P. P., and Sabatini, D. M. 2008. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134:703–707.

Dang, C. V., and Semenza, G. L. 1999. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 24:68–72.

Doenças Genéticas

Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Valle, D., Sly, W. S., Childs, B., Kinzler, K., and Vogelstein, B. (Eds.). 2001. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* (8th ed.). McGraw-Hill.

Evolução

Dandekar, T., Schuster, S., Snel, B., Huynen, M., and Bork, P. 1999. Pathway alignment: Application to the comparative analysis of glycolytic enzymes. *Biochem. J.* 343:115–124.

Heinrich, R., Melendez-Hevia, E., Montero, F., Nuno, J. C., Stephani, A., and Waddell, T. G. 1999. The structural design of glycolysis: An evolutionary approach. *Biochem. Soc. Trans.* 27:294–298.
Walmsley, A. R., Barrett, M. P., Bringaud, F., and Gould, G. W. 1998. Sugar transporters from bacteria, parasites and mammals: Structure-activity relationships. *Trends Biochem. Sci.* 23:476–480.
Maes, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M. H., Backmann, J., Martial, J. A., Wyns, L., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. 1999. The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima:* A comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins* 37:441–453.

Aspectos Históricos

Friedmann, H. C. 2004. From *Butyribacterium* to *E. coli:* An essay on unity in biochemistry. *Perspect. Biol. Med.* 47:47–66.
Fruton, J. S. 1999. *Proteins, Enzymes, Genes: The Interplay of Chemistry and Biology.* Yale University Press.
Kalckar, H. M. (Ed.). 1969. Biological Phosphorylations: Development of Concepts. Prentice Hall.

Capítulo 17

Literatura Básica

Sugden, M. C., and Holness, M. J. 2003. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284:E855–E862.
Owen, O. E., Kalhan, S. C., and Hanson, R. W. 2002. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid function. *J. Biol. Chem.* 277:30409–30412.

Complexo Piruvato Desidrogenase

Hiromasa, Y., Fujisawa, T., Aso, Y., and Roche, T. E. 2004. Organization of the cores of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex formed by E2 and E2 plus the E3-binding proteins and their capacities to bind the E1 and E3 components. *J. Biol Chem.* 279:6921–6933.
Izard, T., Ævarsson, A., Allen, M. D., Westphal, A. H., Perham, R. N., De Kok, A., and Hol, W. G. 1999. Principles of quasi-equivalence and Euclidean geometry govern the assembly of cubic and dodecahedral cores of pyruvate dehydrogenase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:1240–1245.
Domingo, G. J., Chauhan, H. J., Lessard, I. A., Fuller, C., and Perham, R. N. 1999. Self-assembly and catalytic activity of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Bacillus stearothermophilus. Eur. J. Biochem.* 266:1136–1146.
Jones, D. D., Horne, H. J., Reche, P. A., and Perham, R. N. 2000. Structural determinants of post-translational modification and catalytic specificity for the lipoyl domains of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli. J. Mol. Biol.* 295:289–306.

Estrutura das Enzimas do Ciclo do Ácido Cíclico

Fraser, M. E. Hayakawa, K., Hume, M. S., Ryan, D. G., and Brownie, E. R. 2006. Interactions of GTP with the ATP-grasp domain of GTP-specific succinyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.* 281:11058–11065.
Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Léger, C., Byrne, B., Cecchini, G., and Iowata, S. 2003. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 299:700–704.
Chapman, A. D., Cortes, A., Dafforn, T. R., Clarke, A. R., and Brady, R. L. 1999. Structural basis of substrate specificity in malate dehydrogenases: Crystal structure of a ternary complex of porcine cytoplasmic malate dehydrogenase, α-ketomalonate and tetrahydo-NAD. *J. Mol. Biol.* 285:703–712.
Fraser, M. E., James, M. N., Bridger, W. A., and Wolodko, W. T. 1999. A detailed structural description of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase. *J. Mol. Biol.* 285:1633–1653. [Published erratum appears in May 7, 1999, issue of *J. Mol. Biol.* 288(3):501.]
Lloyd, S. J., Lauble, H., Prasad, G. S., and Stout, C. D. 1999. The mechanism of aconitase: 1.8 Å resolution crystal structure of the S642a:citrate complex. *Protein Sci.* 8:2655–2662.
Remington, S. J. 1992. Structure and mechanism of citrate synthase. *Curr. Top. Cell. Regul.* 33:209–229.
Rose, I. A. 1998. How fumarase recycles after the malate → fumarate reaction: Insights into the reaction mechanism. *Biochemistry* 37:17651–17658.

Organização do Ciclo do Ácido Cíclico

Lambeth, D. O., Tews, K. N., Adkins, S., Frohlich, D., and Milavetz, B. I. 2004. Expression of two succinyl-CoA specificities in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* 279:36621–36624.
Velot, C., Mixon, M. B., Teige, M., and Srere, P. A. 1997. Model of a quinary structure between Krebs TCA cycle enzymes: A model for the metabolon. *Biochemistry* 36:14271–14276.

Haggie, P. M., and Brindle, K. M. 1999. Mitochondrial citrate synthase is immobilized in vivo. *J. Biol. Chem.* 274:3941–3945.
Morgunov, I., and Srere, P. A. 1998. Interaction between citrate synthase and malate dehydrogenase: Substrate channeling of oxaloacetate. *J. Biol. Chem.* 273:29540–29544.

Regulação

Phillips, D., Aponte, A. M., French, S. A., Chess, D. J., and Balaban, R. S. 2009. Succinyl-CoA synthetase is a phosphate target for the activation of mitochondrial metabolism. *Biochemistry* 48: 7140–7149.
Taylor, A. B., Hu, G., Hart, P. J., and McAlister-Henn, L. 2008. Allosteric motions in structures of yeast NAD^+-specific isocitrate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 283: 10872–10880.
Green, T., Grigorian, A., Klyuyeva, A., Tuganova, A., Luo, M., and Popov, K. M. 2008. Structural and functional insights into the molecular mechanisms responsible for the regulation of pyruvate dehydrogenase kinase. *J. Biol. Chem.* 283: 15789–15798.
Hiromasa, Y., and Roche, T. E. 2003. Facilitated interaction between the pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2 and the dihydrolipoyl acetyltransferases. *J. Biol. Chem.* 278:33681–33693.
Jitrapakdee, S., and Wallace, J. C. 1999. Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 340:1–16.

Ciclo do Ácido Cíclico e Câncer

Thompson, C. B. 2009. Metabolic enzymes as oncogenes or tumor suppressors. *New Engl. J. Med.* 360:813–815.
McFate, T., Mohyeldin, A., Lu, H., Thakar, J., Henriques, J., Halim, N. D., Wu, H., Schell, M. J., Tsang, T. M., Teahan, O., Zhou, S., Califano, J. A., Jeoung, M. N., Harris, R. A., and Verma, A. 2008. Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. *J. Biol. Chem.* 283: 22700–22708.
Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. 2008. Mitochondria in cancer cells: What is so special about them? *Trends Cell Biol.* 18:165–173.

Aspectos Evolucionários

Meléndez-Hevia, E., Waddell, T. G., and Cascante, M. 1996. The puzzle of the Krebs citric acid cycle: Assembling the pieces of chemically feasible reactions, and opportunism in the design of metabolic pathways in evolution. *J. Mol. Evol.* 43:293–303.
Baldwin, J. E., and Krebs, H. 1981. The evolution of metabolic cycles. *Nature* 291:381–382.
Gest, H. 1987. Evolutionary roots of the citric acid cycle in prokaryotes. *Biochem. Soc. Symp.* 54:3–16.
Weitzman, P. D. J. 1981. Unity and diversity in some bacterial citric acid cycle enzymes. *Adv. Microbiol. Physiol.* 22:185–244.

Descoberta do Ciclo do Ácido Cíclico

Kornberg, H. 2000. Krebs and his trinity of cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1:225–228.
Krebs, H. A., and Johnson, W. A. 1937. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* 4:148–156.
Krebs, H. A. 1970. The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14:154–170.
Krebs, H. A., and Martin, A. 1981. *Reminiscences and Reflections.* Clarendon Press.

Capítulo 18

Literatura Básica

Guarente, L. 2008. Mitochondria: A nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell* 132:171–176.
Wallace, D. C. 2007. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 76:781–821.
Brandt, U. 2006. Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (Complex I). *Annu Rev Biochem.* 75:69–92.
Hosler, J. P., Ferguson-Miller, S., and Mills, D. A. 2006. Energy transduction: Proton transfer through the respiratory complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 75:165–187.
Gray, M. W., Burger, G., and Lang, B. F. 1999. Mitochondrial evolution. *Science* 283:1476–1481.
Shultz, B. E., and Chan, S. I. 2001. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30:23–65.

Livros

Scheffler, I. E. 2007. *Mitochondria.* Wiley.
Lane, N. 2005. *Power, Sex, Suicide: Mitochondria and the Meaning of Life.* Oxford.
Nicholls, D. G., and Ferguson, S. J. 2002. *Bioenergetics 3.* Academic Press.

Cadeia de Transporte de Elétrons

Qin, L., Liu, J., Mills, D. A., Proshlyakov, D. A., Hiser, C., and Ferguson-Miller, S. 2009. Redox-dependent conformational changes in

cytochrome *c* oxidase suggest a gating mechanism for proton uptake. *Biochemistry* 48:5121–5130.
Lill, R. 2009. Function and biogenesis of iron–sulphur proteins. *Nature* 460:831–838.
Cooley, C. W., Lee, D.-W., and Daldal, F. 2009. Across membrane communication between the Q_o and Q_i active sites of cytochrome bc_1. *Biochemistry* 48:1888–1899.
Verkhovskaya, M. L., Belevich, N., Euro, L., Wikström, M., and. Verkhovsky, M. I. 2008. Real-time electron transfer in respiratory complex I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:3763–3767.
Berrisford, J. M., and Sazanov, L. A. 2009. Structural basis for the mechanism of respiratory complex I. *J. Biol. Chem.* 284:29773–29783.
Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., and Enriquez, J. A. 2008. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Molecular Cell* 32:529–539.
Kruse, S. E., Watt, W. C., Marcinek, D. J., Kapur, R. P., Schenkman, K. A., and Palmiter, R. D. 2008. Mice with mitochondrial Complex I deficiency develop a fatal encephalomyopathy. *Cell Metab.* 7:312–320.
Belevich, I., Verkhovsky, M. I., and Wikström, M. 2007. Protoncoupled electron transfer drives the proton pump of cytochrome *c* oxidase. *Nature* 440:829–832.
Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., and Ral, Z. 2005. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121:1043–1057.
Crofts, A. R. 2004. The cytochrome bc_1 complex: Function in the context of structure. *Annu. Rev. Physio*l. 66:689–733.
Bianchi, C., Genova, M. L., Castelli, G. P., and Lenaz, G. 2004. The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supramolecular complex. *J. Biol. Chem.* 279:36562–36569.
Ugalde, C., Vogel, R., Huijbens, R., van den Heuvel, B., Smeitink, J., and Nijtmans, L. 2004. Human mitochondrial Complex I assembles through a combination of evolutionary conserved modules: A framework to interpret Complex I deficiencies. *Hum. Mol. Genet.* 13:2461–2472.
Yagi, T., and Matsuno-Yagi, A. 2003. The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: The secret unlocked. *Biochemistry* 42:2266–2274.
Cecchini, G. 2003. Function and structure of Complex II of the respiratory chain. *Annu. Rev. Biochem.* 72:77–109.
Lange, C., and Hunte, C. 2002. Crystal structure of the yeast cytochrome bc_1 complex with its bound substrate cytochrome *c*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:2800–2805.

Síntese de ATP

Wittig, I., and Hermann, S. 2009. Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1787:672–680.
Junge, W., Sielaff, H., and Engelbrecht S. 2009. Torque generation and elastic power transmission in the rotary F_0F_1-ATPase. *Nature* 459:364–370.
von Ballmoos, C., Cook, G. M., and Dimroth, P. 2008. Unique rotary ATP synthase and its biological diversity. *Annu. Rev. Biophys.* 37:43–64.
Adachi, K., Oiwa, K., Nishizaka, T., Furuike, S., Noji, H., Itoh, H., Yoshida, M., and Kinosita, K., Jr. 2007. Coupling of rotation and catalysis in F_1-ATPase revealed by single-molecule imaging and manipulation. *Cell* 130:309–321.
Chen, C., Ko, Y., Delannoy, M., Ludtke, S. J., Chiu, W., and Pedersen, P. L. 2004. Mitochondrial ATP synthasome: Three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with the carriers for P_i and ADP/ATP. *J. Biol. Chem.* 279:31761–31768.
Noji, H., and Yoshida, M. 2001. The rotary machine in the cell: ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 276:1665–1668.
Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K., Jr., and Yoshida, M. 1998. F_1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps. *Cell* 93:1117–1124.
Kinosita, K., Jr., Yasuda, R., Noji, H., Ishiwata, S., and Yoshida, M. 1998. F_1-ATPase: A rotary motor made of a single molecule. *Cell* 93:21–24.
Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., and Kinosita, K., Jr., 1997. Direct observation of the rotation of F_1-ATPase. *Nature* 386:299–302.
Tsunoda, S. P., Aggeler, R., Yoshida, M., and Capaldi, R. A. 2001. Rotation of the *c* subunit oligomer in fully functional F_1 F_0 ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 987:898–902.
Gibbons, C., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., and Walker, J. 2000. The structure of the central stalk in F_1-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 7:1055–1061.
Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y., and Futai, M. 1999. Mechanical rotation of the *c* subunit oligomer in ATP synthase (F_0F_1): Direct observation. *Science* 286:1722–1724.

Translocadores e Canais

van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P.,

and Teule, G. J. 2009. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* 360:1500–1508.
Cypess, A. M., Sanaz Lehman, S., Gethin Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y.-H., Doria, A., Kolodny, G. M., and Kahn, C. R. 2009. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* 360:1509–1517.
Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.-J., Enerbäck, S., and Nuutila, P. 2009. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* 360:1518–1525.
Bayrhuber, M., Meins, T., Habeck, M., Becker, S., Giller, K., Villinger, S., Vonrhein, C., Griesinger, C., Zweckstetter, M., and Zeth, K. 2008. Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:15370–15375.
Bamber, L., Harding, M., Monné, M., Slotboom, D.-J. and Kunji, E. R. 2007. The yeast mitochoondrial ADP/ATP carrier functions as a monomer in mitochondrial membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 10:10830–10843.
Pebay-Peyroula, E., Dahout, C., Kahn, R., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M., and Brandolin, G. 2003. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* 246: 39–44.
Nicholls, D. G., and Rial, E. 1999. A history of the first uncoupling protein, UCP1. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31:399–406.
Ricquier, D., and Bouillaud, F. 2000. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.* 345:161–179.

Espécies Reativas do Oxigênio, Superóxido Dismutase e Catalase

Forman, H. J., Maiorino, M., and Ursini, F. 2010. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* 49:835–842.
Murphy, M. P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417:1–13.
Leitch, J. M., Yick, P. J., and Culotta, V. V. 2009. The right to choose: Multiple pathways for activating copper, zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 284: 24679–24683.
Winterbourn, C. C. 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* 4:278–286.
Veal, E. A., Day, A. M., and Morgan, B. A. 2007. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol. Cell* 26:1–14.
Stone, J. R., and Yang, S. 2006. Hydrogen peroxide: A signaling messenger. *Antioxid. Redox Signal.* 8(3–4):243–270.
Acker, H. 2005. The oxygen sensing signal cascade under the influence of reactive oxygen species. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360:2201–2210.
Valentine, J. S., Doucette, P. A., and Potter S. Z. 2005. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 74:563–593.
Culotta, V. C. 2000. Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. *Curr. Top. Cell Regul.* 36:117–132.
Morrison, B. M., Morrison, J. H., and Gordon, J. W. 1998. Superoxide dismutase and neurofilament transgenic models of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Exp. Zool.* 282:32–47.
Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. 1983. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* 306:284–287.
Reid, T. J., Murthy, M. R., Sicignano, A., Tanaka, N., Musick, W. D., and Rossmann, M. G. 1981. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78:4767–4771.
Stallings, W. C., Pattridge, K. A., Strong, R. K., and Ludwig, M. L. 1984. Manganese and iron superoxide dismutases are structural homologs. *J. Biol. Chem.* 259:10695–10699.
Hsieh, Y., Guan, Y., Tu, C., Bratt, P. J., Angerhofer, A., Lepock, J. R., Hickey, M. J., Tainer, J. A., Nick, H. S., and Silverman, D. N. 1998. Probing the active site of human manganese superoxide dismutase: The role of glutamine 143. *Biochemistry* 37:4731–4739.

Doenças Mitocondriais

Mitochondria Disease. 2009. A compendium of nine articles on mitochondrial diseases. *Biochem. Biophys. Acta Mol. Basis Disease* 1792:1095–1167.
Cicchetti, F., Drouin-Ouellet, J., and Gross, R. E. 2009. Environmental toxins and Parkinson's disease: What have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends Pharm. Sci.* 30:475–483.
DiMauro, S., and Schon, E. A. 2003. Mitochondrial respiratory-chain disease. *New Engl. J. Med.* 348:2656–2668.
Smeitink, J., van den Heuvel, L., and DiMauro, S. 2001. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat. Rev. Genet.* 2:342–352.
Wallace, D. C. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482–1488.

Apoptose

Qi, S., Pang, Y., Hu, Q., Liu, Q., Li, H., Zhou, Y., He, T., Liang, Q., Liu, Y., Yuan, X., Luo, G., Li, H., Wang, J., Yan, N., and Shi, Y. 2010. Crystal structure of the *Caenorhabditis elegans* apoptosome reveals an octameric assembly of CED-4. *Cell* 141:446–457.
Chan, D. C. 2006. Mitochondria: Dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125:1241–1252.
Green, D. R. 2005. Apoptotic pathways: Ten minutes to dead. *Cell* 121:671–674.

Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y. J., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H.-Y. M., Ravagnan, L., Ferri, K. F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.-Y., Mak, T. W., Zúñiga-Pflücker, J. C., Kroemer, G., and Penninger, J. M. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410:549–554.
Desagher, S., and Martinou, J. C. 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10:369–377.
Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770–776.

Aspectos Históricos

Prebble, J., and Weber, B. 2003. *Wandering in the Gardens of the Mind: Peter Mitchell and the Making of Glynn.* Oxford.
Mitchell, P. 1979. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* 206:1148–1159.
Preeble, J. 2002. Peter Mitchell and the ox phos wars. *Trends Biochem. Sci.* 27:209–212.
Mitchell, P. 1976. Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling: Power transmission by proticity. *Biochem. Soc. Trans.* 4:399–430.
Racker, E. 1980. From Pasteur to Mitchell: A hundred years of bioenergetics. *Fed. Proc.* 39:210–215.
Kalckar, H. M. 1991. Fifty years of biological research: From oxidative phosphorylation to energy requiring transport and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 60:1–37.

Capítulo 19

Literatura Básica

Huber, R. 1989. A structural basis of light energy and electron transfer in biology. *EMBO J.* 8:2125–2147.
Deisenhofer, J., and Michel, H. 1989. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodopseudomonas viridis*. *EMBO J.* 8:2149–2170.
Barber, J., and Andersson, B. 1994. Revealing the blueprint of photosynthesis. *Nature* 370:31–34.

Livros e Revisão Geral

Nelson, N., and Yocum, C. 2006. Structure and functions of photosystems I and II. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:521–565.
Merchant, S., and Sawaya, M. R. 2005. The light reactions: A guide to recent acquisitions for the picture gallery. *Plant Cell* 17:648–663.
Blankenship, R. E. 2002. *Molecular Mechanisms of Photosynthesis.* Wiley-Blackwell.
Raghavendra, A. S. 2000. *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise.* Cambridge University Press.
Nicholls, D. G., and Ferguson, S. J. 2002. *Bioenergetics* (3d ed.). Academic Press.

Mecanismos de Transferência de Elétrons

Beratan, D., and Skourtis, S. 1998. Electron transfer mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:235–243.
Moser, C. C., Keske, J. M., Warncke, K., Farid, R. S., and Dutton, P. L. 1992. Nature of biological electron transfer. *Nature* 355:796–802.
Boxer, S. G. 1990. Mechanisms of long-distance electron transfer in proteins: Lessons from photosynthetic reaction centers. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19:267–299.

Fotossistema II

Kirchhoff, H., Tremmel, I., Haase, W., and Kubitscheck, U. 2004. Supramolecular photosystem II organization in grana of thylakoid membranes: Evidence for a structured arrangement. *Biochemistry* 43:9204–9213.
Diner, B. A., and Rappaport, F. 2002. Structure, dynamics, and energetics of the primary photochemistry of photosystem II of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:551–580.
Zouni, A., Witt, H. T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., and Orth, P. 2001. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* 409:739–743.
Rhee, K. H. 2001. Photosystem II: The solid structural era. *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Struct.* 30:307–328.
Deisenhofer, J., and Michel, H. 1991. High-resolution structures of photosynthetic reaction centers. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20:247–266.

Evolução do Oxigênio

Barber, J. 2008. Crystal structure of the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Inorg. Chem.* 47:1700–1710.
Pushkar, Y., Yano, J., Sauer, K., Boussac, A., and Yachandra, V. K. 2008. Structural changes in the Mn_4Ca cluster and the mechanism of photosynthetic water splitting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:1879–1884.
Renger, G. 2007. Oxidative photosynthetic water splitting: Energetics, kinetics and mechanism. *Photosynth. Res.* 92:407–425.
Renger, G., and Kühn, P. 2007. Reaction pattern and mechanism of light induced oxidative water splitting in photosynthesis. *Biochim.*

Biophys. Acta 1767: 458-471.
Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., and Iwata, S. 2004. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 303:1831–1838.
Hoganson, C. W., and Babcock, G. T. 1997. A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis. *Science* 277:1953–1956.
Yamachandra, V. K., DeRose, V. J., Latimer, M. J., Mukerji, I., Sauer, K., and Klein, M. P. 1993. Where plants make oxygen: A structural model for the photosynthetic oxygen-evolving manganese complex. *Science* 260:675–679.
Peloquin, J. M., and Britt, R. D. 2001. EPR/ENDOR characterization of the physical and electronic structure of the OEC Mn cluster. *Biochim. Biophys. Acta* 1503:96–111.

Fotossistema I e Citocromo *bf*

Iwai, M., Takizawa, K., Tokutsu, R., Okamuro, A., Takahashi, Y., and Minagawa, J. 2010. Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis. *Nature* 464:1210–1214.
Amunts, A., Drory, O., and Nelson, N. 2007. The structure of photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. *Nature* 447:58–63.
Cramer, W. A., Zhang, H., Yan, J., Kurisu, G., and Smith, J. L. 2004. Evolution of photosynthesis: Time-independent structure of the cytochrome b_6f complex. *Biochemistry* 43:5921–5929.
Kargul, J., Nield, J., and Barber, J. 2003. Three-dimensional reconstruction of a light-harvesting complex I-photosystem I (LHCIPSI) supercomplex from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii. J. Biol. Chem.* 278:16135–16141.
Schubert, W. D., Klukas, O., Saenger, W., Witt, H. T., Fromme, P., and Krauss, N. 1998. A common ancestor for oxygenic and anoxygenic photosynthetic systems: A comparison based on the structural model of photosystem I. *J. Mol. Biol.* 280:297–314.
Fotiadis, D., Muller, D. J., Tsiotis, G., Hasler, L., Tittmann, P., Mini, T., Jeno, P., Gross, H., and Engel, A. 1998. Surface analysis of the photosystem I complex by electron and atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* 283:83–94.
Klukas, O., Schubert, W. D., Jordan, P., Krauss, N., Fromme, P., Witt, H. T., and Saenger, W. 1999. Photosystem I, an improved model of the stromal subunits PsaC, PsaD, and PsaE. *J. Biol. Chem.* 274:7351–7360.
Jensen, P. E., Gilpin, M., Knoetzel, J., and Scheller, H. V. 2000. The PSI-K subunit of photosystem I is involved in the interaction between light-harvesting complex I and the photosystem I reaction center core. *J. Biol. Chem.* 275:24701–24708.
Kitmitto, A., Mustafa, A. O., Holzenburg, A., and Ford, R. C. 1998. Three-dimensional structure of higher plant photosystem I determined by electron crystallography. *J. Biol. Chem.* 273:29592–29599.
Krauss, N., Hinrichs, W., Witt, I., Fromme, P., Pritzkow, W., Dauter, Z., Betzel, C., Wilson, K. S., Witt, H. T., and Saenger, W. 1993. Three-dimensional structure of system I photosynthesis at 6 Å resolution. *Nature* 361:326–331.
Malkin, R. 1992. Cytochrome bc_1 and b_6f complexes of photosynthetic membranes. *Photosynth. Res.* 33:121–136.
Karplus, P. A., Daniels, M. J., and Herriott, J. R. 1991. Atomic structure of ferredoxin-$NADP^+$ reductase: Prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Science* 251:60–66.

Síntese de ATP

Vollmar, M., Schlieper, D., Winn, D., Büchner, C., and Groth, G. 2009. Structure of the c14 rotor ring of the proton translocating chloroplast ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 284:18228–18235.
Varco-Merth, B., Fromme, R., Wang, M., and Fromme, P. 2008. Crystallization of the c14-rotor of the chloroplast ATP synthase reveals that it contains pigments. *Biochim. Biophys. Acta* 1777: 605–612.
Richter, M. L., Hein, R., and Huchzermeyer, B. 2000. Important subunit interactions in the chloroplast ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 1458:326–329.
Oster, G., and Wang, H. 1999. ATP synthase: Two motors, two fuels. *Structure* 7:R67–R72.
Weber, J., and Senior, A. E. 2000. ATP synthase: What we know about ATP hydrolysis and what we do not know about ATP synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1458:300–309.

Conjuntos Coletores de Luz

Melkozernov, A. N., Barber, J., and Blankenship, R. E. 2006. Light harvesting in photosystem I supercomplexes. *Biochemistry* 45:331–345.
Conroy, M. J., Westerhuis, W. H., Parkes-Loach, P. S., Loach, P. A., Hunter, C. N., and Williamson, M. P. 2000. The solution structure of *Rhodobacter sphaeroides* LH1β reveals two helical domains separated by a more flexible region: Structural consequences for the LH1 complex. *J. Mol. Biol.* 298:83–94.
Koepke, J., Hu, X., Muenke, C., Schulten, K., and Michel, H. 1996. The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800–850) from *Rhodospirillum molischianum. Structure* 4:581–597.
Grossman, A. R., Bhaya, D., Apt, K. E., and Kehoe, D. M. 1995. Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: Diversity, control, and evolution. *Annu. Rev. Genet.* 29:231–288.

Kühlbrandt, W., Wang, D.-N., and Fujiyoshi, Y. 1994. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367:614–621.

Evolução

Chen, M., and Zhang, Y. 2008. Tracking the molecular evolution of photosynthesis through characterization of atomic contents of the photosynthetic units. *Photosynth. Res.* 97:255–261.
Iverson, T. M. 2006. Evolution and unique bioenergetic mechanisms in oxygenic photosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10(2):91–100.
Cavalier-Smith, T. 2002. Chloroplast evolution: Secondary symbiogenesis and multiple losses. *Curr. Biol.* 12:R62–64.
Nelson, N., and Ben-Shem, A. 2005. The structure of photosystem I and evolution of photosynthesis. *BioEssays* 27:914–922.
Green, B. R. 2001. Was "molecular opportunism" a factor in the evolution of different photosynthetic light-harvesting pigment systems? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:2119–2121.
Dismukes, G. C., Klimov, V. V., Baranov, S. V., Nozlov, Y. N., Das Gupta, J., and Tyryshkin, A. 2001. The origin of atmospheric oxygen on Earth: The innovation of oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:2170–2175.
Moreira, D., Le Guyader, H., and Phillippe, H. 2000. The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. *Nature* 405:69–72.
Cavalier-Smith, T. 2000. Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* 5:174–182.
Blankenship, R. E., and Hartman, H. 1998. The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 23:94–97.

Capítulo 20

Literatura Básica

Ellis, R. J. 2010. Tackling unintelligent design. *Nature* 463: 164–165.
Gutteridge, S., and Pierce, J. 2006. A unified theory for the basis of the limitations of the primary reaction of photosynthetic CO_2 fixation: Was Dr. Pangloss right? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 7203–7204.
Horecker, B. L. 1976. Unravelling the pentose phosphate pathway. In *Reflections on Biochemistry* (pp. 65–72), edited by A. Kornberg, L. Cornudella, B. L. Horecker, and J. Oro. Pergamon.
Levi, P. 1984. Carbon. In *The Periodic Table.* Random House.

Livros e Revisão Geral

Parry, M. A. J., Andralojc, P. J., Mitchell, R. A. C., Madgwick, P. J., and Keys, A. J. 2003. Manipulation of rubisco: The amount, activity, function and regulation. *J. Exp. Bot.* 54:1321–1333.
Spreitzer, R. J., and Salvucci, M. E. 2002. Rubisco: Structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:449–475.
Wood, T. 1985. *The Pentose Phosphate Pathway.* Academic Press.
Buchanan, B. B., Gruissem, W., and Jones, R. L. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* American Society of Plant Physiologists.

Enzimas e Mecanismo da Reação

Harrison, D. H., Runquist, J. A., Holub, A., and Miziorko, H. M. 1998. The crystal structure of phosphoribulokinase from *Rhodobacter sphaeroides* reveals a fold similar to that of adenylate kinase. *Biochemistry* 37:5074–5085.
Miziorko, H. M. 2000. Phosphoribulokinase: Current perspectives on the structure/function basis for regulation and catalysis. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 74:95–127.
Thorell, S., Gergely, P., Jr., Banki, K., Perl, A., and Schneider, G. 2000. The three-dimensional structure of human transaldolase. *FEBS Lett.* 475:205–208.

Fixação do Dióxido de Carbono e Rubisco

Satagopan, S., Scott, S. S., Smith, T. G., and Tabita, F. R. 2009. A rubisco mutant that confers growth under a normally "inhibitory" oxygen concentration. *Biochemistry* 48: 9076–9083.
Tcherkez, G. G. B., Farquhar, G. D., and Andrews, J. T. 2006. Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose bisphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 7246–7251.
Sugawara, H., Yamamoto, H., Shibata, N., Inoue, T., Okada, S., Miyake, C., Yokota, A., and Kai, Y. 1999. Crystal structure of carboxylase reaction-oriented ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from a thermophilic red alga, *Galdieria partita. J. Biol. Chem.* 274:15655–15661.
Hansen, S., Vollan, V. B., Hough, E., and Andersen, K. 1999. The crystal structure of rubisco from *Alcaligenes eutrophus* reveals a novel central eight-stranded b-barrel formed by b-strands from four subunits. *J. Mol. Biol.* 288:609–621.
Knight, S., Andersson, I., and Brändén, C. I. 1990. Crystallographic analysis of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from spinach at 2.4

Å resolution: Subunit interactions and active site. *J. Mol. Biol.* 215:113–160.
Taylor, T. C., and Andersson, I. 1997. The structure of the complex between rubisco and its natural substrate ribulose 1,5-bisphosphate. *J. Mol. Biol.* 265:432–444.
Cleland, W. W., Andrews, T. J., Gutteridge, S., Hartman, F. C., and Lorimer, G. H. 1998. Mechanism of rubisco: The carbamate as general base. *Chem. Rev.* 98:549–561.
Buchanan, B. B. 1992. Carbon dioxide assimilation in oxygenic and anoxygenic photosynthesis. *Photosynth. Res.* 33:147–162.
Hatch, M. D. 1987. C_4 photosynthesis: A unique blend of modified biochemistry, anatomy, and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta* 895:81–106.

Regulação

Lebreton, S., Andreescu, S., Graciet, E., and Gontero, B. 2006. Mapping of the interaction site of CP12 with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii.* Functional consequences for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *FEBS J.* 273:3358–3369.
Graciet, E., Lebreton, S., and Gontero, B. 2004. The emergence of new regulatory mechanisms in the Benson-Calvin pathway via protein-protein interactions: A glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/ CP12/phosphoribulokinase complex. *J. Exp. Bot.* 55:1245–1254.
Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schürmann, P., and Buchanan, B. B. 2003. Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:370–375.
Rokka, A., Zhang, L., and Aro, E.-M. 2001. Rubisco activase: An enzyme with a temperature-dependent dual function? *Plant J.* 25:463–472.
Zhang, N., and Portis, A. R., Jr. 1999. Mechanism of light regulation of rubisco: A specific role for the larger rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:9438–9443.
Wedel, N., Soll, J., and Paap, B. K. 1997. CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:10479–10484.
Avilan, L., Lebreton, S., and Gontero, B. 2000. Thioredoxin activation of phosphoribulokinase in a bi-enzyme complex from *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 275:9447–9451.
Irihimovitch, V., and Shapira, M. 2000. Glutathione redox potential modulated by reactive oxygen species regulates translation of rubisco large subunit in the chloroplast. *J. Biol. Chem.* 275:16289–16295.

Glicose 6-fosfato Desidrogenase

Wang, X.-T., and Engel, P. C. 2009. Clinical mutants of human glucose 6-phosphate dehydrogenase: Impairment of $NADP^+$ binding affects both folding and stability. *Biochim. Biophys. Acta* 1792: 804–809.
Au, S. W., Gover, S., Lam, V. M., and Adams, M. J. 2000. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: The crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Struct. Fold. Des.* 8:293–303.
Salvemini, F., Franze, A., Iervolino, A., Filosa, S., Salzano, S., and Ursini, M. V. 1999. Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. *J. Biol. Chem.* 274:2750–2757.
Tian, W. N., Braunstein, L. D., Apse, K., Pang, J., Rose, M., Tian, X., and Stanton, R. C. 1999. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am. J. Physiol.* 276:C1121–C1131.
Tian, W. N., Braunstein, L. D., Pang, J., Stuhlmeier, K. M., Xi, Q. C., Tian, X., and Stanton, R. C. 1998. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *J. Biol. Chem.* 273:10609–10617.
Ursini, M. V., Parrella, A., Rosa, G., Salzano, S., and Martini, G. 1997. Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. *Biochem. J.* 323:801–806.

Evolução

Deschamps, P., Haferkamp, I., d'Hulst, C., Neuhaus, H. E., and Ball, S. G. 2008. The relocation of starch metabolism to chloroplasts: when, why and how. *Trends Plant Sci.* 13: 574–582.
Coy, J. F., Dubel, S., Kioschis, P., Thomas, K., Micklem, G., Delius, H., and Poustka, A. 1996. Molecular cloning of tissue-specific transcripts of a transketolase-related gene: Implications for the evolution of new vertebrate genes. *Genomics* 32:309–316.
Schenk, G., Layfield, R., Candy, J. M., Duggleby, R. G., and Nixon, P. F. 1997. Molecular evolutionary analysis of the thiamine-diphosphate-dependent enzyme, transketolase. *J. Mol. Evol.* 44:552–572.
Notaro, R., Afolayan, A., and Luzzatto L. 2000. Human mutations in glucose 6-phosphate dehydrogenase reflect evolutionary history. *FASEB J.* 14:485–494.
Wedel, N., and Soll, J. 1998. Evolutionary conserved light regulation of Calvin cycle activity by NADPH-mediated reversible phosphoribulokinase/CP12/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complex dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:9699–9704.

Martin, W., and Schnarrenberger, C. 1997. The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: A case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. *Curr. Genet.* 32:1–18.
Ku, M. S., Kano-Murakami, Y., and Matsuoka, M. 1996. Evolution and expression of C_4 photosynthesis genes. *Plant Physiol.* 111:949–957.
Pereto, J. G., Velasco, A. M., Becerra, A., and Lazcano, A. 1999. Comparative biochemistry of CO_2 fixation and the evolution of autotrophy. *Int. Microbiol.* 2:3–10.

Capítulo 21

Literatura Básica

Krebs, E. G. 1993. Protein phosphorylation and cellular regulation I. *Biosci. Rep.* 13:127–142.
Fischer, E. H. 1993. Protein phosphorylation and cellular regulation II. *Angew. Chem. Int. Ed.* 32:1130–1137.
Johnson, L. N. 1992. Glycogen phosphorylase: Control by phosphorylation and allosteric effectors. *FASEB J.* 6:2274–2282.
Browner, M. F., and Fletterick, R. J. 1992. Phosphorylase: A biological transducer. *Trends Biochem. Sci.* 17:66–71.

Livros e Revisão Geral

Agius, L. 2008. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem. J.* 414:1–18.
Greenberg, C. C., Jurczak, M. J., Danos, A. M., and Brady, M. J. 2006. Glycogen branches out: New perspectives on the role of glycogen metabolism in the integration of metabolic pathways. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291:E1–E8.
Shulman, R. G., and Rothman, D. L. 1996. Enzymatic phosphorylation of muscle glycogen synthase: A mechanism for maintenance of metabolic homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:7491–7495.
Shulman, G. I., and Landau, B. R. 1992. Pathways of glycogen repletion. *Physiol. Rev.* 72:1019–1035.

Estudos da Cristalografia de Raios X

Horcajada, C., Guinovart, J. J., Fita, I., and Ferrer, J. C. 2006. Crystal structure of an archaeal glycogen synthase: Insights into oligomerization and substrate binding of eukaryotic glycogen synthases. *J. Biol. Chem.* 281:2923–2931.
Buschiazzo, A., Ugalde, J. E., Guerin, M. E., Shepard, W., Ugalde, R. A., and Alzari, P. M. 2004. Crystal structure of glycogen synthase: Homologous enzymes catalyze glycogen synthesis and degradation. *EMBO J.* 23:3196–3205.
Gibbons, B. J., Roach, P. J., and Hurley, T. D. 2002. Cyrstal structure of the autocatalytic initiator of glycogen biosynthesis, glycogenin. *J. Mol. Biol.* 319:463–477.
Sprang, S. R., Withers, S. G., Goldsmith, E. J., Fletterick, R. J., and Madsen, N. B. 1991. Structural basis for the activation of glycogen phosphorylase *b* by adenosine monophosphate. *Science* 254:1367–1371.
Johnson, L. N., and Barford, D. 1990. Glycogen phosphorylase: The structural basis of the allosteric response and comparison with other allosteric proteins. *J. Biol. Chem.* 265:2409–2412.
Browner, M. F., Fauman, E. B., and Fletterick, R. J. 1992. Tracking conformational states in allosteric transitions of phosphorylase. *Biochemistry* 31:11297–11304.
Martin, J. L., Johnson, L. N., and Withers, S. G. 1990. Comparison of the binding of glucose and glucose 1-phosphate derivatives to T-state glycogen phosphorylase *b*. *Biochemistry* 29:10745–10757.

Iniciador da Glicogênio Sintase

Lomako, J., Lomako, W. M., and Whelan, W. J. 2004. Glycogenin: The primer for mammalian and yeast glycogen synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1673:45–55.
Lin, A., Mu, J., Yang, J., and Roach, P. J. 1999. Self-glucosylation of glycogenin, the initiator of glycogen biosynthesis, involves an inter-subunit reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 363:163–170.
Roach, P. J., and Skurat, A. V. 1997. Self-glucosylating initiator proteins and their role in glycogen biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 57:289–316.
Smythe, C., and Cohen, P. 1991. The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur. J. Biochem.* 200:625–631.

Mecanismos Catalíticos

Skamnaki, V. T., Owen, D. J., Noble, M. E., Lowe, E. D., Lowe, G., Oikonomakos, N. G., and Johnson, L. N. 1999. Catalytic mechanism of phosphorylase kinase probed by mutational studies. *Biochemistry* 38:14718–14730.
Buchbinder, J. L., and Fletterick, R. J. 1996. Role of the active site gate of glycogen phosphorylase in allosteric inhibition and substrate binding. *J. Biol. Chem.* 271:22305–22309.
Palm, D., Klein, H. W., Schinzel, R., Buehner, M., and Helmreich, E. J. M. 1990. The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen

phosphorylase catalysis. *Biochemistry* 29:1099–1107.

Regulação do Metabolismo do Glicogênio

Boulatnikov, I. G., Peters, J. L., Nadeau, O. W., Sage, J. M., Daniels, P. J., Kumar, P., Walsh, D. A., and Carlson, G. M. 2009. Expressed phosphorylase *b* kinase and its *agd* subcomplex as regulatory models for the rabbit skeletal muscle holoenzyme. *Biochemistry* 48:10183–10191.

Ros, S., García-Rocha, M., Domínguez, J., Ferrer, J. C., and Guinovart, J. J. 2009. Control of liver glycogen synthase activity and intracellular distribution by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 284:6370–6378.

Danos, A. M., Osmanovic, S., and Brady, M. J. 2009. Differential regulation of glycogenolysis by mutant protein phosphatase-1 glycogen-targeting subunits. *J. Biol. Chem.* 284:19544–19553.

Pautsch, A., Stadler, N., Wissdorf, O., Langkopf, E., Moreth, M., and Streicher, R. 2008. Molecular recognition of the protein phosphatase 1 glycogen targeting subunit by glycogen phosphorylase. *J. Biol. Chem.* 283:8913–8918.

Jope, R. S., and Johnson, G. V. W. 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 29:95–102.

Doble, B. W., and Woodgett, J. R. 2003. GSK-3: Tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* 116:1175–1186.

Pederson, B. A., Cheng, C., Wilson, W. A., and Roach, P. J. 2000. Regulation of glycogen synthase: Identification of residues involved in regulation by the allosteric ligand glucose-6-P and by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275:27753–27761.

Melendez, R., Melendez-Hevia, E., and Canela, E. I. 1999. The fractal structure of glycogen: A clever solution to optimize cell metabolism. *Biophys. J.* 77:1327–1332.

Franch, J., Aslesen, R., and Jensen, J. 1999. Regulation of glycogen synthesis in rat skeletal muscle after glycogen-depleting contractile activity: Effects of adrenaline on glycogen synthesis and activation of glycogen synthase and glycogen phosphorylase. *Biochem. J.* 344(pt.1):231–235.

Aggen, J. B., Nairn, A. C., and Chamberlin, R. 2000. Regulation of protein phosphatase-1. *Chem. Biol.* 7:R13–R23.

Egloff, M. P., Johnson, D. F., Moorhead, G., Cohen, P. T., Cohen, P., and Barford, D. 1997. Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J.* 16:1876–1887.

Wu, J., Liu, J., Thompson, I., Oliver, C. J., Shenolikar, S., and Brautigan, D. L. 1998. A conserved domain for glycogen binding in protein phosphatase-1 targeting subunits. *FEBS Lett.* 439:185–191.

Doenças Genéticas

Nyhan, W. L., Barshop, B. A., and Ozand, P. T. 2005. *Atlas of Metabolic Diseases.* (2d ed., pp. 373–408). Hodder Arnold.

Chen, Y.-T. 2001. Glycogen storage diseases. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases* (8th ed., pp. 1521–1552), edited by C. R. Scriver., W. S. Sly, B. Childs, A. L. Beaudet, D. Valle, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. McGraw-Hill.

Burchell, A., and Waddell, I. D. 1991. The molecular basis of the hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system. *Biochim. Biophys. Acta* 1092:129–137.

Lei, K. J., Shelley, L. L., Pan, C. J., Sidbury, J. B., and Chou, J. Y. 1993. Mutations in the glucose-6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type Ia. *Science* 262:580–583.

Ross, B. D., Radda, G. K., Gadian, D. G., Rocker, G., Esiri, M., and Falconer-Smith, J. 1981. Examination of a case of suspected McArdle's syndrome by ^{31}P NMR. *N. Engl. J. Med.* 304:1338–1342.

Evolução

Holm, L., and Sander, C. 1995. Evolutionary link between glycogen phosphorylase and a DNA modifying enzyme. *EMBO J.* 14:1287–1293.

Hudson, J. W., Golding, G. B., and Crerar, M. M. 1993. Evolution of allosteric control in glycogen phosphorylase. *J. Mol. Biol.* 234:700–721.

Rath, V. L., and Fletterick, R. J. 1994. Parallel evolution in two homologues of phosphorylase. *Nat. Struct. Biol.* 1:681–690.

Melendez, R., Melendez-Hevia, E., and Cascante, M. 1997. How did glycogen structure evolve to satisfy the requirement for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building. *J. Mol. Evol.* 45:446–455.

Rath, V. L., Lin, K., Hwang, P. K., and Fletterick, R. J. 1996. The evolution of an allosteric site in phosphorylase. *Structure* 4:463–473.

Capítulo 22

Literatura Básica

Rinaldo, P., Matern, D., and Bennet, M. J. 2002. Fatty acid oxidation disorders. *Annu. Rev. Physiol.* 64:477–502.

Rasmussen, B. B., and Wolfe, R. R. 1999. Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Annu. Rev. Nutr.* 19:463–484.

Semenkovich, C. F. 1997. Regulation of fatty acid synthase (FAS). *Prog. Lipid Res.* 36:43–53.

Sul, H. S., Smas, C. M., Wang, D., and Chen, L. 1998. Regulation of fat synthesis and adipose differentiation. *Prog. Nucleic Acid Res.*

Mol. Biol. 60:317–345.
Wolf, G. 1996. Nutritional and hormonal regulation of fatty acid synthase. *Nutr. Rev.* 54:122–123.

Livros

Vance, D. E., and Vance, J. E. (Eds.). 2008. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes.* Elsevier.
Stipanuk, M. H. (Ed.). 2006. *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition.* Saunders.

Oxidação do Ácido Graxo

Ahmadian, M., Duncan, R. E., and Sul, H. S. 2009. The skinny on fat: Lipolysis and fatty acid utilization in adipocytes. *Trends Endocrinol. Metab.* 20:424–428.
Farese, R. V., Jr., and Walther, T. C. 2009. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139:855–860.
Goodman, J. L. 2008. The gregarious lipid droplet. *J. Biol. Chem.* 283:28005–28009.
Saha, P. K., Kojima, H., Marinez-Botas, J., Sunehag, A. L., and Chan, L. 2004. Metabolic adaptations in absence of perilipin. *J. Biol. Chem.* 279:35150–35158.
Barycki, J. J., O'Brien, L. K., Strauss, A. W., and Banaszak, L. J. 2000. Sequestration of the active site by interdomain shifting: Crystallographic and spectroscopic evidence for distinct conformations of L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 275:27186–27196.
Ramsay, R. R. 2000. The carnitine acyltransferases: Modulators of acyl-CoA-dependent reactions. *Biochem. Soc. Trans.* 28:182–186.
Eaton, S., Bartlett, K., and Pourfarzam, M. 1996. Mammalian mitochondrial b-oxidation. *Biochem. J.* 320:345–357.
Thorpe, C., and Kim, J. J. 1995. Structure and mechanism of action of the acyl-CoA dehydrogenases. *FASEB J.* 9:718–725.

Síntese do Ácido Graxo

Maier, T., Leibundgut, M., and Ban, N. 2008. The crystal structure of a mammalian fatty acid synthase. *Science* 321:1315–1322.
Kuhajda, F. P. 2006. Fatty acid synthase and cancer: New application of an old pathway. *Cancer Res.* 66:5977–5980.
Ming, D., Kong, Y., Wakil, S. J., Brink, J., and Ma, J. 2002. Domain movements in human fatty acid synthase by quantized elastic deformational model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:7895–7899.
Zhang, Y.-M., Rao, M. S., Heath, R. J., Price, A. C., Olson, A. J., Rock, C. O., and White, S. W. 2001. Identification and analysis of the acyl carrier protein (ACP) docking site on b-ketoacyl-ACP synthase III. *J. Biol. Chem.* 276:8231–8238.
Davies, C., Heath, R. J., White, S. W., and Rock, C. O. 2000. The 1.8 Å crystal structure and active-site architecture of b-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) from *Escherichia coli. Struct. Fold. Design* 8:185–195.
Denton, R. M., Heesom, K. J., Moule, S. K., Edgell, N. J., and Burnett, P. 1997. Signalling pathways involved in the stimulation of fatty acid synthesis by insulin. *Biochem. Soc. Trans.* 25:1238–1242.
Loftus, T. M., Jaworsky, D. E., Frehywot, G. L., Townsend, C. A., Ronnett, G. V., Lane, M. D., and Kuhajda, F. P. 2000. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288:2379–2381.

Acetil-CoA Carboxilase

Brownsey, R. W., Boone, A. N., Elliott, J. E., Kulpa, J. E., and Lee, W. M. 2006. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem. Soc. Trans.* 34:223–227.
Munday, M. R. 2002. Regulation of acetyl CoA carboxylase. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 1059–1064.
Thoden, J. B., Blanchard, C. Z., Holden, H. M., and Waldrop, G. L. 2000. Movement of the biotin carboxylase B-domain as a result of ATP binding. *J. Biol. Chem.* 275:16183–16190.

Eicosanoides

Harizi, H., Corcuff, J.-B., and Gualde, N. 2008. Arachidonic-acidderived eicosanoids: Roles in biology and immunopathology. *Trends Mol. Med.* 14:461–469.
Nakamura, M. T., and Nara, T. Y. 2004. Structure, function, and dietary regulation of Δ6, Δ5, and Δ9 desaturases. *Annu. Rev. Nutr.* 24:345–376.
Malkowski, M. G., Ginell, S. L., Smith, W. L., and Garavito, R. M. 2000. The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science* 289:1933–1937.
Smith, T., McCracken, J., Shin, Y.-K., and DeWitt, D. 2000. Arachidonic acid and nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce conformational changes in the human prostaglandin endoperoxide H_2 synthase-2 (cyclooxygenase-2). *J. Biol. Chem.* 275:40407–40415.
Kalgutkar, A. S., Crews, B. C., Rowlinson, S. W., Garner, C., Seibert, K., and Marnett L. J. 1998. Aspirin-like molecules that covalently inactivate cyclooxygenase-2. *Science* 280:1268–1270.
Lands, W. E. 1991. Biosynthesis of prostaglandins. *Annu. Rev. Nutr.* 11:41–60.
Sigal, E. 1991. The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. *Am. J. Physiol.* 260:L13–L28.

Weissmann, G. 1991. Aspirin. *Sci. Am.* 264(1):84–90.
Vane, J. R., Flower, R. J., and Botting, R. M. 1990. History of aspirin and its mechanism of action. *Stroke* (12 suppl.):IV12–IV23.

Doenças Genéticas

Nyhan, W. L., Barshop, B. A., and Ozand, P. T. 2005. *Atlas of Metabolic Diseases* (2d ed., pp. 339–300). Hodder Arnold.
Roe, C. R., and Coates, P. M. 2001. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases* (8th ed., pp. 2297–2326), edited by C. R. Scriver., W. S. Sly, B. Childs, A. L. Beaudet, D. Valle, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. McGraw-Hill.
Brivet, M., Boutron, A., Slama, A., Costa, C., Thuillier, L., Demaugre, F., Rabier, D., Saudubray, J. M., and Bonnefont, J. P. 1999. Defects in activation and transport of fatty acids. *J. Inherit. Metab. Dis.* 22:428–441.
Wanders, R. J., van Grunsven, E. G., and Jansen, G. A. 2000. Lipid metabolism in peroxisomes: Enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid α-and β-oxidation systems in humans. *Biochem. Soc. Trans.* 28:141–149.
Wanders, R. J., Vreken, P., den Boer, M. E., Wijburg, F. A., van Gennip, A. H., and Ijist, L. 1999. Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA β-oxidation. *J. Inherit. Metab. Dis.* 22:442–487.
Kerner, J., and Hoppel, C. 1998. Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management. *Annu. Rev. Nutr.* 18:179–206.
Bartlett, K., and Pourfarzam, M. 1998. Recent developments in the detection of inherited disorders of mitochondrial b-oxidation. *Biochem. Soc. Trans.* 26:145–152.
Pollitt, R. J. 1995. Disorders of mitochondrial long-chain fatty acid oxidation. *J. Inherit. Metab. Dis.* 18:473–490.

Capítulo 23

Literatura Básica

Ubiquitin-Mediated Protein Regulation. 2009. *Annu. Rev. Biochem.* 78: A series of reviews on the various roles of ubiquitin.
Torchinsky, Y. M. 1989. Transamination: Its discovery, biological and chemical aspects. *Trends Biochem. Sci.* 12:115–117.
Eisensmith, R. C., and Woo, S. L. C. 1991. Phenylketonuria and the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol. Biol. Med.* 8:3–18.
Schwartz, A. L., and Ciechanover, A. 1999. The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu. Rev. Med.* 50:57–74.
Watford, M. 2003. The urea cycle. *Biochem. Mol. Biol. Ed.* 31:289–297.

Livros

Bender, D. A. 1985. *Amino Acid Metabolism* (2d ed.). Wiley.
Lippard, S. J., and Berg, J. M. 1994. *Principles of Bioinorganic Chemistry.* University Science Books.
Walsh, C. 1979. *Enzymatic Reaction Mechanisms.* W. H. Freeman and Company.
Christen, P., and Metzler, D. E. 1985. *Transaminases.* Wiley.

Ubiquitina e Proteassoma

Greer, P. L., Hanayama, R., Bloodgood, B. L., Mardinly, A. R., Lipton, D. M., Flavell, S.W., Kim, T.-K., Griffith, E. C., Waldon, Z., Maehr, R., Ploegh, H. L., Chowdhury, S., Worley, P. F., Steen, J., and Greenberg, M. E. 2010. The Angelman syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating Arc. *Cell* 140: 704–716.
Peth, A., Besche, H. C., and Goldberg A. L. 2009. Ubiquitinated proteins activate the proteasome by binding to Usp14/Ubp6, which causes 20S gate opening. *Mol. Cell* 36: 794–804.
Cheng, Y. 2009. Toward an atomic model of the 26S proteasome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19:203–208.
Lin, G., Li, D., Carvalho, L. P. S., Deng, H., Tao, H., Vogt, G., Wu, K., Schneider, J., Chidawanyika, T., Warren, J. D., Li, H., and Nathan, C. 2009. Inhibitors selective for mycobacterial versus human proteasomes. *Nature* 461: 621–626.
Wang, K. H., Roman-Hernandez, G., Grant, R. A., Sauer, R. T., and Baker, T. A. 2008. The molecular basis of N-end rule recognition. *Mol. Cell* 32: 406–414.
da Fonseca, P. C. A., and Morris, E. P. 2008. Structure of the human 26S proteasome: Subunit radial displacements open the gate into the proteolytic core. *J. Biol. Chem.* 283: 23305–23314.
Cooper, E. M., Hudson, A. W., Amos, J., Wagstaff, J., and Howley, P. M. 2004. Biochemical analysis of Angelman syndrome-associated mutation in the E3 ubiquitin ligase E6-associated protein. *J. Biol. Chem.* 279:41208–41217.
Giasson, B. I. and Lee, V. M.-Y. 2003. Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell* 114:1–8.
Pagano, M., and Benmaamar, R. 2003. When protein destruction runs amok, malignancy is on the loose. *Cancer Cell* 4:251–256.
Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C. M. 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19:94–102.

Hochstrasser, M. 2000. Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat. Cell Biol.* 2:E153–E157.

Enzimas Dependentes de Piridoxal Fosfato

Eliot, A. C., and Kirsch, J. F. 2004. Pyridoxal phosphate enzymes: Mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu. Rev. Biochem.* 73:383–415.
Mehta, P. K., and Christen, P. 2000. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 74:129–184.
Schneider, G., Kack, H., and Lindqvist, Y. 2000. The manifold of vitamin B_6 dependent enzymes. *Structure Fold Des.* 8:R1–R6.

Enzimas do Ciclo da Ureia

Morris, S. M., Jr. 2002. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 22:87–105.
Huang, X., and Raushel, F. M. 2000. Restricted passage of reaction intermediates through the ammonia tunnel of carbamoyl phosphate synthetase. *J. Biol. Chem.* 275:26233–26240.
Lawson, F. S., Charlebois, R. L., and Dillon, J. A. 1996. Phylogenetic analysis of carbamoylphosphate synthetase genes: Complex evolutionary history includes an internal duplication within a gene which can root the tree of life. *Mol. Biol. Evol.* 13:970–977.
McCudden, C. R., and Powers-Lee, S. G. 1996. Required allosteric effector site for *N*-acetylglutamate on carbamoyl-phosphate synthetase I. *J. Biol. Chem.* 271:18285–18294.

Degradação do Aminoácido

Li, M., Smith, C. J., Walker, M. T., and Smith, T. J. 2009. Novel inhibitors complexed with glutamate dehydrogenase: allosteric regulation by control of protein dynamics. *J. Biol. Chem.* 284:22988–23000.
Smith, T. J., and Stanley, C. A. 2008. Untangling the glutamate dehydrogenase allosteric nightmare. *Trends Biochem. Sci.* 33: 557–564.
Fusetti, F., Erlandsen, H., Flatmark, T., and Stevens, R. C. 1998. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J. Biol. Chem.* 273:16962–16967.
Titus, G. P., Mueller, H. A., Burgner, J., Rodriguez De Cordoba, S., Penalva, M. A., and Timm, D. E. 2000. Crystal structure of human homogentisate dioxygenase. *Nat. Struct. Biol.* 7:542–546.
Erlandsen, H., and Stevens, R. C. 1999. The structural basis of phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* 68:103–125.

Doenças Genéticas

Jayakumar, A. R., Liu, M., Moriyama, M. Ramakrishnan, R., Forbush III, B., Reddy, P. V. V., and Norenberg, M.D. 2008. Na-K-Cl cotransporter-1 in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *J. Biol. Chem.* 283: 33874–33882.
Scriver, C. R., and Sly, W. S. (Eds.), Childs, B., Beaudet, A. L., Valle, D., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. 2001. *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (8th ed.). McGraw-Hill.

Aspectos Históricos e o Processo do Descobrimento

Cooper, A. J. L., and Meister, A. 1989. An appreciation of Professor Alexander E. Braunstein: The discovery and scope of enzymatic transamination. *Biochimie* 71:387–404.
Garrod, A. E. 1909. *Inborn Errors in Metabolism.* Oxford University Press (reprinted in 1963 with a supplement by H. Harris).
Childs, B. 1970. Sir Archibald Garrod's conception of chemical individuality: A modern appreciation. *N. Engl. J. Med.* 282:71–78.
Holmes, F. L. 1980. Hans Krebs and the discovery of the ornithine cycle. *Fed. Proc.* 39:216–225.

Capítulo 24

Literatura Básica

Kim, J., and Rees, D. C. 1989. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry* 33:389–397.
Christen, P., Jaussi, R., Juretic, N., Mehta, P. K., Hale, T. I., and Ziak, M. 1990. Evolutionary and biosynthetic aspects of aspartate aminotransferase isoenzymes and other aminotransferases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 585:331–338.
Schneider, G., Kack, H., and Lindqvist, Y. 2000. The manifold of vitamin B6 dependent enzymes. *Structure Fold Des.* 8:R1–R6.
Rhee, S. G., Chock, P. B., and Stadtman, E. R. 1989. Regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase. *Adv. Enzymol. Mol. Biol.* 62:37–92.
Shemin, D. 1989. An illustration of the use of isotopes: The biosynthesis of porphyrins. *Bioessays* 10:30–35.

Livros

Bender, D. A. 1985. *Amino Acid Metabolism* (2d ed.). Wiley.
Jordan, P. M. (Ed.). 1991. *Biosynthesis of Tetrapyrroles.* Elsevier.
Scriver, C. R. (Ed.), Sly, W. S. (Ed.), Childs, B., Beaudet, A. L., Valle, D., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. 2001. *The Metabolic Basis*

of Inherited Disease (8th ed.). McGraw-Hill.
Meister, A. 1965. *Biochemistry of the Amino Acids* (vols. 1 and 2, 2d ed.). Academic Press.
McMurry, J. E., and Begley, T. P. 2005. *The Organic Chemistry of Biological Pathways.* Roberts and Company.
Blakley, R. L., and Benkovic, S. J. 1989. *Folates and Pterins* (vol. 2). Wiley.
Walsh, C. 1979. *Enzymatic Reaction Mechanisms.* W. H. Freeman and Company.

Fixação de Nitrogênio

Seefeldt, L. C., Hoffman, B. M., and Dean, D. R. 2009. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annu. Rev. Biochem.* 79:701–722.
Halbleib, C. M., and Ludden, P. W. 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutr.* 130:1081–1084.
Einsle, O., Tezcan, F. A., Andrade, S. L., Schmid, B., Yoshida, M., Howard, J. B., and Rees, D. C. 2002. Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: A central ligand in the FeMo-cofactor. *Science* 297:1696–1700.
Benton, P. M., Laryukhin, M., Mayer, S. M., Hoffman, B. M., Dean, D. R., and Seefeldt, L. C. 2003. Localization of a substrate binding site on the FeMo-cofactor in nitrogenase: Trapping propargyl alcohol with an α-70-substituted MoFe protein. *Biochemistry* 42: 9102–9109.
Peters, J. W., Fisher, K., and Dean, D. R. 1995. Nitrogenase structure and function: A biochemical-genetic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:335–366.
Leigh, G. J. 1995. The mechanism of dinitrogen reduction by molybdenum nitrogenases. *Eur. J. Biochem.* 229:14–20.
Georgiadis, M. M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J. J., and Rees, D. C. 1992. Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii. Science* 257:1653–1659.

Regulação da Biossíntese de Aminoácido

Eisenberg, D., Gill, H. S., Pfluegl, G. M., and Rotstein, S. H. 2000. Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim. Biophys. Acta* 1477:122–145.
Purich, D. L. 1998. Advances in the enzymology of glutamine synthesis. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 72:9–42.
Yamashita, M. M., Almassy, R. J., Janson, C. A., Cascio, D., and Eisenberg, D. 1989. Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 264:17681–17690.
Schuller, D. J., Grant, G. A., and Banaszak, L. J. 1995. The allosteric ligand site in the V_{max}-type cooperative enzyme phosphoglycerate dehydrogenase. *Nat. Struct. Biol.* 2:69–76.
Rhee, S. G., Park, R., Chock, P. B., and Stadtman, E. R. 1978. Allosteric regulation of monocyclic interconvertible enzyme cascade systems: Use of *Escherichia coli* glutamine synthetase as an experimental model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3138–3142.
Wessel, P. M., Graciet, E., Douce, R., and Dumas, R. 2000. Evidence for two distinct effector-binding sites in threonine deaminase by site-directed mutagenesis, kinetic, and binding experiments. *Biochemistry* 39:15136–15143.
James, C. L., and Viola, R. E. 2002. Production and characterization of bifunctional enzymes: Domain swapping to produce new bifunctional enzymes in the aspartate pathway. *Biochemistry* 41: 3720–3725.
Xu, Y., Carr, P. D., Huber, T., Vasudevan, S. G., and Ollis, D. L. 2001. The structure of the P_{II}-ATP complex. *Eur. J. Biochem.* 268: 2028–2037.
Krappmann, S., Lipscomb, W. N., and Braus, G. H. 2000. Coevolution of transcriptional and allosteric regulation at the chorismate metabolic branch point of *Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:13585–13590.

Biossíntese do Aminoácido Aromático

Brown, K. A., Carpenter, E. P., Watson, K. A., Coggins, J. R., Hawkins, A. R., Koch, M. H., and Svergun, D. I. 2003. Twists and turns: A tale of two shikimate-pathway enzymes. *Biochem. Soc. Trans.* 31:543–547.
Pan, P., Woehl, E., and Dunn, M. F. 1997. Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. *Trends Biochem. Sci.* 22:22–27.
Sachpatzidis, A., Dealwis, C., Lubetsky, J. B., Liang, P. H., Anderson, K. S., and Lolis, E. 1999. Crystallographic studies of phosphonate-based α-reaction transition-state analogues complexed to tryptophan synthase. *Biochemistry* 38:12665–12674.
Weyand, M., and Schlichting, I. 1999. Crystal structure of wild-type tryptophan synthase complexed with the natural substrate indole-3-glycerol phosphate. *Biochemistry* 38:16469–16480.
Crawford, I. P. 1989. Evolution of a biosynthetic pathway: The tryptophan paradigm. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:567–600.
Carpenter, E. P., Hawkins, A. R., Frost, J. W., and Brown, K. A. 1998. Structure of dehydroquinate synthase reveals an active site capable of multistep catalysis. *Nature* 394:299–302.
Schlichting, I., Yang, X. J., Miles, E. W., Kim, A. Y., and Anderson, K. S. 1994. Structural and kinetic analysis of a channel-impaired mutant of tryptophan synthase. *J. Biol. Chem.* 269:26591–26593.

Glutationa

Edwards, R., Dixon, D. P., and Walbot, V. 2000. Plant glutathione *S*-transferases: Enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 5:193–198.
Lu, S. C. 2000. Regulation of glutathione synthesis. *Curr. Top. Cell Regul.* 36:95–116.
Schulz, J. B., Lindenau, J., Seyfried, J., and Dichgans, J. 2000. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* 267:4904–4911.
Lu, S. C. 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: Current concepts and controversies. *FASEB J.* 13:1169–1183.
Salinas, A. E., and Wong, M. G. 1991. Glutathione *S*-transferases: A review. *Curr. Med. Chem.* 6:279–309.

Etileno e Óxido Nítrico

Nisoli, E., Falcone, S., Tonello, C., Cozzi, V., Palomba, L., Fiorani, M., Pisconti, A., Brunelli, S., Cardile, A., Francolini, M., Cantoni, O., Carruba, M. O., Moncada, S., and Clementi, E. 2004. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 101:16507–16512.
Bretscher, L. E., Li, H., Poulos, T. L. and Griffith, O. W. 2003. Structural characterization and kinetics of nitric oxide synthase inhibition by novel N^5-(iminoalkyl)- and N^5-(iminoalkenyl)-ornithines. *J. Biol. Chem.* 278:46789–46797.
Haendeler, J., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. 1999. Nitric oxide and apoptosis. *Vitam. Horm.* 57:49–77.
Capitani, G., Hohenester, E., Feng, L., Storici, P., Kirsch, J. F., and Jansonius, J. N. 1999. Structure of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in the biosynthesis of the plant hormone ethylene. *J. Mol. Biol.* 294:745–756.
Hobbs, A. J., Higgs, A., and Moncada, S. 1999. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:191–220.
Stuehr, D. J. 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim. Biophys. Acta* 1411:217–230.
Chang, C., and Shockey, J. A. 1999. The ethylene-response pathway: Signal perception to gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:352–358.
Theologis, A. 1992. One rotten apple spoils the whole bushel: The role of ethylene in fruit ripening. *Cell* 70:181–184.

Biossíntese da Porfirina

Kaasik, K. and Lee, C. C. 2004. Reciprocal regulation of haem biosynthesis and the circadian clock in mammals. *Nature* 430:467–471.
Leeper, F. J. 1989. The biosynthesis of porphyrins, chlorophylls, and vitamin B12. *Nat. Prod. Rep.* 6:171–199.
Porra, R. J., and Meisch, H.-U. 1984. The biosynthesis of chlorophyll. *Trends Biochem. Sci.* 9:99–104.

Capítulo 25

Literatura Básica

Sutherland, J. D. 2010. Ribonucleotides. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a005439.
Ordi, J., Alonso, P. L., de Zulueta, J., Esteban, J., Velasco, M., Mas, E., Campo, E., and Fernández, P. L. 2006. The severe gout of Holy Roman Emperor Charles V. *N. Eng. J. Med.* 355: 516–520.
Kappock, T. J., Ealick, S. E., and Stubbe, J. 2000. Modular evolution of the purine biosynthetic pathway. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:567–572.
Jordan, A., and Reichard, P. 1998. Ribonucleotide reductases. *Annu. Rev. Biochem.* 67:71–98.

Biossíntese da Pirimidina

Raushel, F. M., Thoden, J. B., Reinhart, G. D., and Holden, H. M. 1998. Carbamoyl phosphate synthetase: A crooked path from substrates to products. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:624–632.
Huang, X., Holden, H. M., and Raushel, F. M. 2001. Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 70:149–180.
Begley, T. P., Appleby, T. C., and Ealick, S. E. 2000. The structural basis for the remarkable proficiency of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:711–718.
Traut, T. W., and Temple, B. R. 2000. The chemistry of the reaction determines the invariant amino acids during the evolution and divergence of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 275:28675–28681.

Biossíntese da Purina

An, S., Kyoung, M., Allen, J. J., Shokat, K. M., and Benkovic, S. J. 2010. Dynamic regulation of a metabolic multi-enzyme complex by protein kinase CK2. *J. Biol. Chem.* 285: 11093–11099.
An, S., Kumar, R., Sheets, E. D., and Benkovic, S. J. 2008. Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells. *Science* 320: 103–106.
Thoden, J. B., Firestine, S., Nixon, A., Benkovic, S. J., and Holden, H. M. 2000. Molecular structure of *Escherichia coli* PurT-encoded

glycinamide ribonucleotide transformylase. *Biochemistry* 39:8791–8802.
McMillan, F. M., Cahoon, M., White, A., Hedstrom, L., Petsko, G. A., and Ringe, D. 2000. Crystal structure at 2.4 Å resolution of *Borrelia burgdorferi* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase: Evidence of a substrate-induced hinged-lid motion by loop 6. *Biochemistry* 39:4533–4542.
Levdikov, V. M., Barynin, V. V., Grebenko, A. I., Melik-Adamyan, W. R., Lamzin, V. S., and Wilson, K. S. 1998. The structure of SAICAR synthase: An enzyme in the de novo pathway of purine nucleotide biosynthesis. *Structure* 6:363–376.
Smith, J. L., Zaluzec, E. J., Wery, J. P., Niu, L., Switzer, R. L., Zalkin, H., and Satow, Y. 1994. Structure of the allosteric regulatory enzyme of purine biosynthesis. *Science* 264:1427–1433.
Weber, G., Nagai, M., Natsumeda, Y., Ichikawa, S., Nakamura, H., Eble, J. N., Jayaram, H. N., Zhen, W. N., Paulik, E., and Hoffman, R. 1991. Regulation of de novo and salvage pathways in chemotherapy. *Adv. Enzyme Regul.* 31:45–67.

Ribonucleotídio Redutase

Cotruvo, Jr., J. A., and Stubbe, J. 2010. An active dimanganese(III)-tyrosyl radical cofactor in *Escherichia coli* class Ib ribonucleotide reductase. *Biochemistry* 49:1297–1309.
Avval, F. Z., and Holmgren, A. 2009. Molecular mechanisms of thioredoxin and glutaredoxin as hydrogen donors for mammalian S phase ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 284: 8233–8240.
Rofougaran, R., Crona M., Vodnala, M., Sjöberg, B. M., and Hofer, A. 2008. Oligomerization status directs overall activity regulation of the *Escherichia coli* class Ia ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 283: 35310–35318.
Nordlund, P., and Reichard, P. 2006. Ribonucleotide reductases. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 681–706.
Eklund, H., Uhlin, U., Farnegardh, M., Logan, D. T. and Nordlund, P. 2001. Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 77:177–268.
Reichard, P. 1997. The evolution of ribonucleotide reduction. *Trends Biochem. Sci.* 22:81–85.
Stubbe, J. 2000. Ribonucleotide reductases: The link between an RNA and a DNA world? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:731–736.
Logan, D. T., Andersson, J., Sjoberg, B. M., and Nordlund, P. 1999. A glycyl radical site in the crystal structure of a class III ribonucleotide reductase. *Science* 283:1499–1504.
Tauer, A., and Benner, S. A. 1997. The B_{12}-dependent ribonucleotide reductase from the archaebacterium *Thermoplasma acidophila:* An evolutionary solution to the ribonucleotide reductase conundrum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:53–58.
Stubbe, J., Nocera, D. G., Yee, C. S. and Chang, M. C. 2003. Radical initiation in the class I ribonucleotide reductase: Long-range proton-coupled electron transfer? *Chem. Rev.* 103:2167–2201.
Stubbe, J., and Riggs-Gelasco, P. 1998. Harnessing free radicals: Formation and function of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase. *Trends Biochem. Sci.* 23:438–443.

Timidilato Sintase e Di-hidrofolato Redutase

Abali, E. E., Skacel, N. E., Celikkaya, H., and Hsieh, Y.-C. 2008. Regulation of human dihydrofolate reductase activity and expression. *Vitam. Horm.* 79:267–292.
Schnell, J. R., Dyson, H. J., and Wright, P. E. 2004. Structure, dynamics, and catalytic function of dihydrofolate reductase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33:119–140.
Li, R., Sirawaraporn, R., Chitnumsub, P., Sirawaraporn, W., Wooden, J., Athappilly, F., Turley, S., and Hol, W. G. 2000. Three-dimensional structure of *M. tuberculosis* dihydrofolate reductase reveals opportunities for the design of novel tuberculosis drugs. *J. Mol. Biol.* 295:307–323.
Liang, P. H., and Anderson, K. S. 1998. Substrate channeling and domain-domain interactions in bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase. *Biochemistry* 37:12195–12205.
Miller, G. P., and Benkovic, S. J. 1998. Stretching exercises: Flexibility in dihydrofolate reductase catalysis. *Chem. Biol.* 5:R105–R113.
Carreras, C. W., and Santi, D. V. 1995. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu. Rev. Biochem.* 64:721–762.
Schweitzer, B. I., Dicker, A. P., and Bertino, J. R. 1990. Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. *FASEB J.* 4:2441–2452.

Defeitos na Biossíntese de Nucleotídio

Aiuti, A., Cattaneo, F., Galimberti, S., Benninghoff, U., et al. 2009. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 360:447–58.
Jurecka, A. 2009. Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 32:247–263.
Nyhan, W. L., Barshop, B. A., and Ozand, P. T. 2005. *Atlas of Metabolic Diseases.* (2d ed., pp. 429–462). Hodder Arnold.
Scriver, C. R., Sly, W. S., Childs, B., Beaudet, A. L., Valle, D., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (Eds.). 2001. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases* (8th ed., pp. 2513–2704). McGraw-Hill.
Nyhan, W. L. 1997. The recognition of Lesch-Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism. *J. Inherited Metab. Dis.* 20:

171–178.
Wong, D. F., Harris, J. C., Naidu, S., Yokoi, F., Marenco, S., Dannals, R. F., Ravert, H. T., Yaster, M., Evans, A., Rousset, O., Bryan, R. N., Gjedde, A., Kuhar, M. J., and Breese, G. R. 1996. Dopamine transporters are markedly reduced in Lesch-Nyhan disease in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:5539–5543.
Resta, R., and Thompson, L. F. 1997. SCID: The role of adenosine deaminase deficiency. *Immunol. Today* 18:371–374.
Neychev, V. K., and Mitev, V. I. 2004. The biochemical basis of the neurobehavioral abnormalities in the Lesch-Nyhan syndrome: A hypothesis. *Med. Hypotheses* 63:131–134.

Capítulo 26

Literatura Básica

Brown, M. S., and Goldstein, J. L. 2009. Cholesterol feedback: From Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J. Lipid Res.* 50:S15–S27.
Gimpl, G., Burger, K., and Fahrenholz, F. 2002. A closer look at the cholesterol sensor. *Trends Biochem. Sci.* 27:595–599.
Oram, J. F. 2002. Molecular basis of cholesterol homeostasis: Lessons from Tangier disease and ABCA1. *Trends Mol. Med.* 8:168–173.
Vance, D. E., and Van den Bosch, H. 2000. Cholesterol in the year 2000. *Biochim. Biophys. Acta* 1529:1–8.
Endo, A. 1992. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J. Lipid Res.* 33:1569–1582.

Livros

Vance, J. E., and Vance, D. E. (Eds.). 2008. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes.* Elsevier.
Nyhan, W. L., Barshop, B. A., and Ozand, P. T. 2005. *Atlas of Metabolic Diseases.* (2d ed., pp. 567–696). Hodder Arnold.
Scriver, C. R., Sly, W. S., Childs, B., Beaudet, A. L., Valle, D., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (Eds.). 2001. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases* (8th ed., pp. 2707–2960). McGraw-Hill.

Fosfolipídio e Esfingolipídio

Carman, G. M., and Han, G.-S. 2009. Phosphatidic acid phosphatase, a key enzyme in the regulation of lipid synthesis. *J. Biol. Chem.* 284:2593–2597.
Bartke, N., and Hannun, Y. A. 2009. Bioactive sphingolipids: Metabolism and function. *J. Lipid Res.* 50:S91–S96.
Lee, J., Johnson, J., Ding, Z., Paetzel, M., and Cornell, R. B. 2009. Crystal structure of a mammalian CTP: Phosphocholine cytidylyltransferase catalytic domain reveals novel active site residues within a highly conserved nucleotidyltransferase fold. *J. Biol. Chem.* 284:33535–33548.
Nye, C. K., Hanson, R. W., and Kalhan, S. C. 2008. Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis *in vivo* in the rat. *J. Biol. Chem.* 283:27565–27574.
Kent, C. 1995. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 64:315–343.

Biossíntese de Colesterol e Esteroides

Radhakrishnan, A., Goldstein, J. L., McDonald, J. G., and Brown, M. S. 2008. Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: A delicate balance. *Cell Metab.* 8:512–521.
DeBose-Boyd, R. A. 2008. Feedback regulation of cholesterol synthesis: Sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res.* 18:609–621.
Hampton, R. Y. 2002. Proteolysis and sterol regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18:345–378.
Kelley, R. I., and Herman, G. E. 2001. Inborn errors of sterol biosynthesis. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 2:299–341.
Istvan, E. S., and Deisenhofer, J. 2001. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292:1160–1164.
Ness, G. C., and Chambers, C. M. 2000. Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: The concept of cholesterol buffering capacity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 224:8–19.
Libby, P., Aikawa, M., and Schonbeck, U. 2000. Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1529:299–309.
Yokoyama, S. 2000. Release of cellular cholesterol: Molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochim. Biophys. Acta* 1529:231–244.
Cronin, S. R., Khoury, A., Ferry, D. K., and Hampton, R. Y. 2000. Regulation of HMG-CoA reductase degradation requires the P-type ATPase Cod1p/Spf1p. *J. Cell Biol.* 148:915–924.
Edwards, P. A., Tabor, D., Kast, H. R., and Venkateswaran, A. 2000. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim. Biophys. Acta* 1529:103–113.
Istvan, E. S., Palnitkar, M., Buchanan, S. K., and Deisenhofer, J. 2000. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: Insights into regulation of activity and catalysis. *EMBO J.* 19:819–830.
Jeon, H., Meng, W., Takagi, J., Eck, M. J., Springer, T. A., and Blacklow, S. C. 2001. Implications for familial hypercholesterolemia from

the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. *Nat. Struct. Biol.* 8:499–504.

Lipoproteínas e seus Receptores

Rye, K-A., Bursill, C. A., Lambert, G., Tabet, F., and Barter, P. J. 2009. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J. Lipid Res.* 50:S195–S200.

Rader, D. J., Alexander, E. T., Weibel, G. L., Billheimer, J., and Rothblat, G. H. 2009. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 50:S189–S194.

Tall, A. R., Yvan-Charvet, L., Terasaka, N., Pagler, T., and Wang, N. 2008. HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: Implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab.* 7:365–375.

Jeon, H., and Blacklow, S. C. 2005. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu. Rev. Biochem.* 74:535–562.

Beglova, N., and Blacklow, S. C. 2005. The LDL receptor: How acid pulls the trigger. *Trends Biochem. Sci.* 30:309–316.

Brouillette, C. G., Anantharamaiah, G. M., Engler, J. A., and Borhani, D. W. 2001. Structural models of human apolipoprotein A-I: A critical analysis and review. *Biochem. Biophys. Acta* 1531:4–46.

Hevonoja, T., Pentikainen, M. O., Hyvonen, M. T., Kovanen, P. T., and Ala-Korpela, M. 2000. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim. Biophys. Acta* 1488:189–210.

Silver, D. L., Jiang, X. C., Arai, T., Bruce, C., and Tall, A. R. 2000. Receptors and lipid transfer proteins in HDL metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 902:103–111.

Nimpf, J., and Schneider, W. J. 2000. From cholesterol transport to signal transduction: Low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor-2. *Biochim. Biophys. Acta* 1529:287–298.

Ativação do Oxigênio e Citocromo P450

Stiles, A. R., McDonald, J. G., Bauman, D. R., and Russell, D. W. 2009. CYP7B1: One cytochrome P450, two human genetic diseases, and multiple physiological functions. *J. Biol. Chem.* 284:28485–28489.

Zhou, S.-F., Liu, J.-P., and Chowbay, B. 2009. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab. Rev.* 4:89–295.

Williams, P. A., Cosme, J., Vinkovic, D. M., Ward, A., Angove, H. C., Day, P. J., Vonrhein, C., Tickle, I. J., and Jhoti, H. 2004. Crystal structure of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science* 305:683–686.

Ingelmn-Sundberg, M., Oscarson, M., and McLellan, R. A. 1999. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: An opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol. Sci.* 20:342–349.

Capítulo 27

Livros

Wrangham, R. 2009. *Catching Fire: How Cooking Made Us Human.* Basic Books.

Stipanuk, M. H. (Ed.). 2006. *Biochemical, Physiological, & Molecular Aspects of Human Nutrition.* Saunders-Elsevier.

Fell, D. 1997. *Understanding the Control of Metabolism.* Portland Press.

Frayn, K. N. 1996. *Metabolic Regulation: A Human Perspective.* Portland Press.

Poortmans, J. R. (Ed.). 2004. *Principles of Exercise Biochemistry.* Karger.

Harris, R. A., and Crabb, D. W. 2006. Metabolic interrelationships. In *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations* (pp. 849–890), edited by T. M. Devlin. Wiley-Liss.

Homeostasia Calórica

Woods, S. C. 2009. The control of food intake: Behavioral versus molecular perspectives. *Cell Metab.* 9:489–498.

Figlewicz, D. P., and Benoit, S. C. 2009. Insulin, leptin, and food reward: Update 2008. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 296:R9–R19.

Israel, D., and Chua, S. Jr. 2009. Leptin receptor modulation of adiposity and fertility. *Trends Endocrinol. Metab.* 21:10–16.

Meyers, M. G., Cowley, M. A., and Münzberg, H. 2008. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 70:537–556.

Sowers, J. R. 2008. Endocrine functions of adipose tissue: Focus on adiponectin. *Clin. Cornerstone* 9:32–38.

Brehma, B. J., and D'Alessio, D. A. 2008. Benefits of high-protein weight loss diets: Enough evidence for practice? *Curr. Opin. Endocrinol., Diabetes, Obesity* 15:416–421.

Coll, A. P., Farooqi, I. S., and O'Rahillt, S. O. 2007. The hormonal control of food intake. *Cell* 129:251–262.

Muoio, D. M., and Newgard, C. B. 2006. Obesity-related derangements in metabolic regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 75:367–401.

Diabetes Melito

Zhang, B. B., Zhou, G., and Li, C. 2009. AMPK: An emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab.* 9:407–416.

Magkos, F., Yannakoulia, M., Chan, J. L., and Mantzoros, C. S. 2009. Management of the metabolic syndrome and type 2 diabetes through lifestyle modification. *Annu. Rev. Nutr.* 29:8.1–8.34.

Muoio, D. M., and Newgard, C. B. 2008. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β-cell failure in type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9:193–205.

Leibiger, I. B., Leibiger, B., and Berggren, P.-O. 2008. Insulin signaling in the pancreatic b-cell. *Annu. Rev. Nutr.* 28:233–251.

Doria, A., Patti, M. E., and Kahn, C. R. 2008. The emerging architecture of type 2 diabetes. *Cell Metab.* 8:186–200.

Croker, B. A., Kiu, H., and Nicholson, S. E. 2008. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19:414–422.

Eizirik, D. L., Cardozo, A. K., and Cnop, M. 2008. The role of endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocrinol. Rev.* 29:42–61.

Howard, J. K., and Flier, J. S. 2006. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol. Metab.* 9:365–371.

Lowel, B. B., and Shulman, G. 2005. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307:384–387.

Taylor, S. I. 2001. Diabetes mellitus. In *The Metabolic Basis of Inherited Diseases* (8th ed., pp. 1433–1469), edited by C. R. Scriver, W. S. Sly, B. Childs, A. L. Beaudet, D. Valle, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. McGraw-Hill.

Metabolismo do Exercício

Hood, D. A. 2001. Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 90:1137–1157.

Shulman, R. G., and Rothman, D. L. 2001. The "glycogen shunt" in exercising muscle: A role for glycogen in muscle energetics and fatigue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:457–461.

Gleason, T. 1996. Post-exercise lactate metabolism: A comparative review of sites, pathways, and regulation. *Annu. Rev. Physiol.* 58:556–581.

Holloszy, J. O., and Kohrt, W. M. 1996. Regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise. *Annu. Rev. Nutr.* 16:121–138.

Hochachka, P. W., and McClelland, G. B. 1997. Cellular metabolic homeostasis during large-scale change in ATP turnover rates in muscles. *J. Exp. Biol.* 200:381–386.

Horowitz, J. F., and Klein, S. 2000. Lipid metabolism during endurance exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 72:558S–563S.

Wagenmakers, A. J. 1999. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise. *Diabetes Nutr. Metab.* 12:316–322.

Adaptações Metabólicas na Inanição

Baverel, G., Ferrier, B., and Martin, M. 1995. Fuel selection by the kidney: Adaptation to starvation. *Proc. Nutr. Soc.* 54:197–212.

MacDonald, I. A., and Webber, J. 1995. Feeding, fasting and starvation: Factors affecting fuel utilization. *Proc. Nutr. Soc.* 54:267–274.

Cahill, G. F., Jr. 1976. Starvation in man. *Clin. Endocrinol. Metab.* 5:397–415.

Sugden, M. C., Holness, M. J., and Palmer, T. N. 1989. Fuel selection and carbon flux during the starved-to-fed transition. *Biochem. J.* 263:313–323.

Metabolismo do Etanol

Nagy, L. E. 2004. Molecular aspects of alcohol metabolism: Transcription factors involved in early-induced liver injury. *Annu. Rev. Nutr.* 24:55–78.

Molotkov, A., and Duester, G. 2002. Retinol/ethanol drug interaction during acute alcohol intoxication involves inhibition of retinol metabolism to retinoic acid by alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 277:22553–22557.

Stewart, S., Jones, D., and Day, C. P. 2001. Alcoholic liver disease: New insights into mechanisms and preventive strategies. *Trends Mol. Med.* 7:408–413.

Lieber, C. S. 2000. Alcohol: Its metabolism and interaction with nutrients. *Annu. Rev. Nutr.* 20:395–430.

Niemela, O. 1999. Aldehyde-protein adducts in the liver as a result of ethanol-induced oxidative stress. *Front. Biosci.* 1:D506–D513.

Riveros-Rosas, H., Julian-Sanchez, A., and Pina, E. 1997. Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. *Arch. Med. Res.* 28:453–471.

Capítulo 28

Literatura Básica

Johnson, A., and O'Donnell, M. 2005. Cellular DNA replicases: Components and dynamics at the replication fork. *Annu. Rev. Biochem.*

74:283–315.
Kornberg, A. 1988. DNA replication. *J. Biol. Chem.* 263:1–4.
Wang, J. C. 1982. DNA topoisomerases. *Sci. Am.* 247(1):94–109.
Lindahl, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709–715.
Greider, C. W., and Blackburn, E. H. 1996. Telomeres, telomerase, and cancer. *Sci. Am.* 274(2):92–97.

Livros

Kornberg, A., and Baker, T. A. 1992. *DNA Replication* (2d ed.). W. H. Freeman and Company.
Bloomfield, V. A., Crothers, D., Tinoco, I., and Hearst, J. 2000. *Nucleic Acids: Structures, Properties and Functions.* University Science Books.
Friedberg, E. C., Walker, G. C., and Siede, W. 1995. *DNA Repair and Mutagenesis.* American Society for Microbiology.
Cozzarelli, N. R., and Wang, J. C. (Eds.). 1990. *DNA Topology and Its Biological Effects.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Topologia do DNA e Topoisomerases

Graille, M., Cladiere, L., Durand, D., Lecointe, F., Gadelle, D., Quevillon-Cheruel, S., Vachette, P., Forterre, P., and van Tilbeurgh, H. 2008. Crystal structure of an intact type II DNA topoisomerase: Insights into DNA transfer mechanisms. *Structure* 16:360–370.
Charvin, G., Strick, T. R., Bensimon, D., and Croquette, V. 2005. Tracking topoisomerase activity at the single-molecule level. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34:201–219.
Sikder, D., Unniraman, S., Bhaduri, T., and Nagaraja, V. 2001. Functional cooperation between topoisomerase I and single strand DNA-binding protein. *J. Mol. Biol.* 306:669 – 679.
Yang, Z., and Champoux, J. J. 2001. The role of histidine 632 in catalysis by human topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 276:677 – 685.
Fortune, J. M., and Osheroff, N. 2000. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: When enzymes stop being nice. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 64:221–253.
Isaacs, R. J., Davies, S. L., Sandri, M. I., Redwood, C., Wells, N. J., and Hickson, I. D. 1998. Physiological regulation of eukaryotic topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta* 1400:121 – 137.
Wang, J. C. 1996. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 65:635–692.
Wang, J. C. 1998. Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: The story of a simple molecular machine. *Q. Rev. Biophys.* 31:107 – 144.
Baird, C. L., Harkins, T. T., Morris, S. K., and Lindsley, J. E. 1999. Topoisomerase II drives DNA transport by hydrolyzing one ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:13685 – 13690.
Vologodskii, A. V., Levene, S. D., Klenin, K. V., Frank, K. M., and Cozzarelli, N. R. 1992. Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* 227:1224–1243.
Fisher, L. M., Austin, C. A., Hopewell, R., Margerrison, M., Oram, M., Patel, S., Wigley, D. B., Davies, G. J., Dodson, E. J., Maxwell, A., and Dodson, G. 1991. Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Nature* 351:624– 629.

Mecanismo da Replicação

Davey, M. J., and O'Donnell, M. 2000. Mechanisms of DNA replication. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:581– 586.
Keck, J. L., and Berger, J. M. 2000. DNA replication at high resolution. *Chem. Biol.* 7:R63–R71.
Kunkel, T. A., and Bebenek, K. 2000. DNA replication fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* 69:497–529.
Waga, S., and Stillman, B. 1998. The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 67:721–751.
Marians, K. J. 1992. Prokaryotic DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 61:673–719.

DNA Polimerases e Outras Enzimas de Replicação

Singleton, M. R., Sawaya, M. R., Ellenberger, T., and Wigley, D. B. 2000. Crystal structure of T7 gene 4 ring helicase indicates a mechanism for sequential hydrolysis of nucleotides. *Cell* 101:589–600.
Donmez, I., and Patel, S. S. 2006. Mechanisms of a ring shaped helicase. *Nucleic Acids Res.* 34:4216–4224.
Johnson, D. S., Bai, L., Smith, B. Y., Patel, S. S., and Wang, M. D. 2007. Single-molecule studies reveal dynamics of DNA unwinding by the ring-shaped T7 helicase. *Cell* 129:1299 – 1309.
Lee, S. J., Qimron, U., and Richardson, C. C. 2008. Communication between subunits critical to DNA binding by hexameric helicase of bacteriophage T7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:8908–8913.
Toth, E. A., Li, Y., Sawaya, M. R., Cheng, Y., and Ellenberger, T. 2003. The crystal structure of the bifunctional primase-helicase of bacteriophage T7. *Mol. Cell* 12:1113–1123.
Hubscher, U., Maga, G., and Spadari, S. 2002. Eukaryotic DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* 71:133 – 163.
Doublié, S., Tabor, S., Long, A. M., Richardson, C. C., and Ellenberger, T. 1998. Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution. *Nature* 391:251 – 258.

Arezi, B., and Kuchta, R. D. 2000. Eukaryotic DNA primase. *Trends Biochem. Sci.* 25:572– 576.
Jager, J., and Pata, J. D. 1999. Getting a grip: Polymerases and their substrate complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:21 – 28.
Steitz, T. A. 1999. DNA polymerases: Structural diversity and common mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274:17395–17398.
Beese, L. S., Derbyshire, V., and Steitz, T. A. 1993. Structure of DNA polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA. *Science* 260:352–355.
McHenry, C. S. 1991. DNA polymerase III holoenzyme: Components, structure, and mechanism of a true replicative complex. *J. Biol. Chem.* 266:19127–19130.
Kong, X. P., Onrust, R., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. 1992. Three-dimensional structure of the b subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: A sliding DNA clamp. *Cell* 69:425–437.
Polesky, A. H., Steitz, T. A., Grindley, N. D., and Joyce, C. M. 1990. Identification of residues critical for the polymerase activity of the Klenow fragment of DNA polymerase I from *Escherichia coli. J. Biol. Chem.* 265:14579–14591.
Lee, J. Y., Chang, C., Song, H. K., Moon, J., Yang, J. K., Kim, H. K., Kwon, S. T., and Suh, S. W. 2000. Crystal structure of NAD^+ dependent DNA ligase: Modular architecture and functional implications. *EMBO J.* 19:1119–1129.
Timson, D. J., and Wigley, D. B. 1999. Functional domains of an NAD^+-dependent DNA ligase. *J. Mol. Biol.* 285:73 – 83.
Doherty, A. J., and Wigley, D. B. 1999. Functional domains of an ATP-dependent DNA ligase. *J. Mol. Biol.* 285:63–71.
von Hippel, P. H., and Delagoutte, E. 2001. A general model for nucleic acid helicases and their "coupling" within macromolecular machines. *Cell* 104:177–190.
Tye, B. K., and Sawyer, S. 2000. The hexameric eukaryotic MCM helicase: Building symmetry from nonidentical parts. *J. Biol. Chem.* 275:34833–34836.
Marians, K. J. 2000. Crawling and wiggling on DNA: Structural insights to the mechanism of DNA unwinding by helicases. *Struct. Fold. Des.* 5:R227–R235.
Soultanas, P., and Wigley, D. B. 2000. DNA helicases: "Inching forward." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:124 – 128.
de Lange, T. 2009. How telomeres solve the end-protection problem. *Science* 326:948–952.
Bachand, F., and Autexier, C. 2001. Functional regions of human telomerase reverse transcriptase and human telomerase RNA required for telomerase activity and RNA-protein interactions. *Mol. Cell Biol.* 21:1888–1897.
Bryan, T. M., and Cech, T. R. 1999. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:318–324.
Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97:503–514.
McEachern, M. J., Krauskopf, A., and Blackburn, E. H. 2000. Telomeres and their control. *Annu. Rev. Genet.* 34:331 – 358.

Mutações e Reparo do DNA

Yang, W. 2003. Damage repair DNA polymerases Y. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13:23–30.
Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J., and Lindahl, T. 2001. Human DNA repair genes. *Science* 291:1284 – 1289.
Shin, D. S., Chahwan, C., Huffman, J. L., and Tainer, J. A. 2004. Structure and function of the double-strand break repair machinery. *DNA Repair (Amst.)* 3:863 – 873.
Michelson, R. J., and Weinert, T. 2000. Closing the gaps among a web of DNA repair disorders. *Bioessays* 22:966 – 969.
Aravind, L., Walker, D. R., and Koonin, E. V. 1999. Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res.* 27:1223–1242.
Mol, C. D., Parikh, S. S., Putnam, C. D., Lo, T. P., and Tainer, J. A. 1999. DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28:101–128.
Parikh, S. S., Mol, C. D., and Tainer, J. A. 1997. Base excision repair enzyme family portrait: Integrating the structure and chemistry of an entire DNA repair pathway. *Structure* 5:1543 – 1550.
Vassylyev, D. G., and Morikawa, K. 1997. DNA-repair enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:103–109.
Verdine, G. L., and Bruner, S. D. 1997. How do DNA repair proteins locate damaged bases in the genome? *Chem. Biol.* 4:329– 334.
Bowater, R. P., and Wells, R. D. 2000. The intrinsically unstable life of DNA triplet repeats associated with human hereditary disorders. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 66:159–202.
Cummings, C. J., and Zoghbi, H. Y. 2000. Fourteen and counting: Unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum. Mol. Genet.* 9:909–916.

Reparo Defeituoso do DNAe Câncer

Berneburg, M., and Lehmann, A. R. 2001. Xeroderma pigmentosum and related disorders: Defects in DNA repair and transcription. *Adv. Genet.* 43:71–102.
Lambert, M. W., and Lambert, W. C. 1999. DNA repair and chromatin structure in genetic diseases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 63:257–310.
Buys, C. H. 2000. Telomeres, telomerase, and cancer. *N. Engl. J. Med.* 342:1282–1283.

Urquidi, V., Tarin, D., and Goodison, S. 2000. Role of telomerase in cell senescence and oncogenesis. *Annu. Rev. Med.* 51:65 – 79.
Lynch, H. T., Smyrk, T. C., Watson, P., Lanspa, S. J., Lynch, J. F., Lynch, P. M., Cavalieri, R. J., and Boland, C. R. 1993. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer: An updated review. *Gastroenterology* 104:1535–1549.
Fishel, R., Lescoe, M. K., Rao, M. R. S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Garber, J., Kane, M., and Kolodner, R. 1993. The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75:1027–1038.
Ames, B. N., and Gold, L. S. 1991. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat. Res.* 250:3– 16.
Ames, B. N. 1979. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* 204:587– 593.

Recombinação e Recombinase

Singleton, M. R., Dillingham, M. S., Gaudier, M., Kowalczykowski, S. C., and Wigley, D. B. 2004. Crystal structure of RecBCD enzyme reveals a machine for processing DNA breaks. *Nature* 432:187–193.
Spies, M., Bianco, P. R., Dillingham, M. S., Handa, N., Baskin, R. J., and Kowalczykowski, S. C. 2003. A molecular throttle: The recombination hotspot chi controls DNA translocation by the RecBCD helicase. *Cell* 114:647–654.
Kowalczykowski, S. C. 2000. Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem. Sci.* 25:156–165.
Prevost, C., and Takahashi, M. 2003. Geometry of the DNA strands within the RecA nucleofilament: Role in homologous recombination. *Q. Rev. Biophys.* 36:429–453.
Van Duyne, G. D. 2001. A structural view of Cre-loxP site-specific recombination. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30:87– 104.
Chen, Y., Narendra, U., Iype, L. E., Cox, M. M., and Rice, P. A. 2000. Crystal structure of a Flp recombinase-Holliday junction complex: Assembly of an active oligomer by helix swapping. *Mol. Cell* 6:885–897.
Craig, N. L. 1997. Target site selection in transposition. *Annu. Rev. Biochem.* 66:437–474.
Gopaul, D. N., Guo, F., and Van Duyne, G. D. 1998. Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-loxP site-specific recombination. *EMBO J.* 17:4175–4187.
Gopaul, D. N., and Duyne, G. D. 1999. Structure and mechanism in site-specific recombination. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:14–20.

Capítulo 29

Literatura Básica

Kornberg, R. D. 2007. The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:12955–12961.
Woychik, N. A. 1998. Fractions to functions: RNA polymerase II thirty years later. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 63:311–317.
Losick, R. 1998. Summary: Three decades after sigma. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 63:653–666.
Ast, G. 2005. The alternative genome. *Sci. Am.* 292(4):40–47.
Sharp, P. A. 1994. Split genes and RNA splicing (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:1229–1240.
Cech, T. R. 1990. Nobel lecture: Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from *Tetrahymena*. *Biosci. Rep.* 10:239–261.
Villa, T., Pleiss, J. A., and Guthrie, C. 2002. Spliceosomal snRNAs: Mg^{2+} dependent chemistry at the catalytic core? *Cell* 109:149–152.

Livros

Lewin, B. 2007. *Genes* (9th ed.). Jones and Bartlett.
Kornberg, A., and Baker, T. A. 1992. *DNA Replication* (2d ed.). W. H. Freeman and Company.
Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Krieger, M., Kaiser, C. A., Scott, M. P., Bretscher, A., Plough, H., and Darnell, J. 2008. *Molecular Cell Biology* (6th ed.). W. H. Freeman and Company.
Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., and Losick, R. 2004. *Molecular Biology of the Gene* (5th ed.). Pearson/Benjamin Cummings.
Gesteland, R. F., Cech, T., and Atkins, J. F. 2006. *The RNA World: The Nature of Modern RNA Suggests a Prebiotic RNA* (3d ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press.

RNA Polimerases

Liu, X., Bushnell, D. A., Wang, D., Calero, G., and Kornberg, R. D. 2010. Structure of an RNA polymerase II-TFIIB complex and the transcription initiation mechanism. *Science* 327:206–209.
Wang, D., Bushnell, D. A., Huang, X., Westover, K. D., Levitt, M., and Kornberg, R. D. 2009. Structural basis of transcription: Backtracked RNA polymerase II at 3.4 angstrom resolution. *Science* 324:1203–1206.
Darst, S. A. 2001. Bacterial RNA polymerase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11:155–162.

Ross, W., Gosink, K. K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K., and Gourse, R. L. 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* 262:1407–1413.

Cramer, P., Bushnell, D. A., and Kornberg, R. D. 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Å resolution. *Science* 292:1863–1875.

Gnatt, A. L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D. A., and Kornberg, R. D. 2001. Structural basis of transcription: An RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science* 292:1876–1882.

Zhang, G., Campbell, E. A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., and Darst, S. A. 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* 98:811–824.

Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., and Darst, S. A. 2001. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* 104:901–912.

Darst, S. A. 2004. New inhibitors targeting bacterial RNA polymerase. *Trends Biochem. Sci.* 29:159–160.

Cheetham, G. M., and Steitz, T. A. 1999. Structure of a transcribing T7 RNA polymerase initiation complex. *Science* 286:2305–2309.

Ebright, R. H. 2000. RNA polymerase: Structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J. Mol. Biol.* 304:687–698.

Paule, M. R., and White, R. J. 2000. Survey and summary: Transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* 28:1283–1298.

Iniciação e Alongamento

Murakami, K. S., and Darst, S. A. 2003. Bacterial RNA polymerases: The whole story. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13:31–39.

Buratowski, S. 2000. Snapshots of RNA polymerase II transcription initiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:320–325. Conaway, J. W., and Conaway, R. C. 1999. Transcription elongation and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 68:301–319.

Conaway, J. W., Shilatifard, A., Dvir, A., and Conaway, R. C. 2000. Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 25:375–380.

Korzheva, N., Mustaev, A., Kozlov, M., Malhotra, A., Nikiforov, V., Goldfarb, A., and Darst, S. A. 2000. A structural model of transcription elongation. *Science* 289:619–625.

Reines, D., Conaway, R. C., and Conaway, J. W. 1999. Mechanism and regulation of transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:342–346.

Promoteres, Amplificadores, e Fatores de Transcrição

Merika, M., and Thanos, D. 2001. Enhanceosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:205–208.

Park, J. M., Gim, B. S., Kim, J. M., Yoon, J. H., Kim, H. S., Kang, J. G., and Kim, Y. J. 2001. *Drosophila* mediator complex is broadly utilized by diverse gene-specific transcription factors at different types of core promoters. *Mol. Cell. Biol.* 21:2312–2323.

Smale, S. T., and Kadonaga, J. T. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 72:449–479.

Gourse, R. L., Ross, W., and Gaal, T. 2000. Ups and downs in bacterial transcription initiation: The role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol. Microbiol.* 37:687– 695.

Fiering, S., Whitelaw, E., and Martin, D. I. 2000. To be or not to be active: The stochastic nature of enhancer action. *Bioessays* 22:381–387.

Hampsey, M., and Reinberg, D. 1999. RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:132–139.

Chen, L. 1999. Combinatorial gene regulation by eukaryotic transcription factors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:48–55.

Muller, C. W. 2001. Transcription factors: Global and detailed views. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11:26–32.

Reese, J. C. 2003. Basal transcription factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13:114–118.

Kadonaga, J. T. 2004. Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* 116:247–257.

Harrison, S. C. 1991. A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* 353:715–719.

Sakurai, H., and Fukasawa, T. 2000. Functional connections between mediator components and general transcription factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275:37251–37256.

Droge, P., and Muller-Hill, B. 2001. High local protein concentrations at promoters: Strategies in prokaryotic and eukaryotic cells. *Bioessays* 23:179–183.

Smale, S. T., Jain, A., Kaufmann, J., Emami, K. H., Lo, K., and Garraway, I. P. 1998. The initiator element: A paradigm for core promoter heterogeneity within metazoan protein-coding genes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 63:21–31.

Kim, Y., Geiger, J. H., Hahn, S., and Sigler, P. B., 1993. Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature* 365:512–520.

Kim, J. L., Nikolov, D. B., and Burley, S. K., 1993. Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature* 365:520–527.

White, R. J., and Jackson, S. P., 1992. The TATA-binding protein: A central role in transcription by RNA polymerases I, II and III. *Trends Genet.* 8:284–288.

Martinez, E. 2002. Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol. Biol.* 50:925–947.
Meinhart, A., Kamenski, T., Hoeppner, S., Baumli, S., and Cramer, P. 2005. A structural perspective of CTD function. *Genes Dev.* 19:1401–1415.
Palancade, B., and Bensaude, O. 2003. Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 270:3859–3870.

Término

Burgess, B. R., and Richardson, J. P. 2001. RNA passes through the hole of the protein hexamer in the complex with *Escherichia coli* Rho factor. *J. Biol. Chem.* 276:4182–4189.
Yu, X., Horiguchi, T., Shigesada, K., and Egelman, E. H. 2000. Three-dimensional reconstruction of transcription termination factor rho: Orientation of the N-terminal domain and visualization of an RNA-binding site. *J. Mol. Biol.* 299:1279–1287.
Stitt, B. L. 2001. *Escherichia coli* transcription termination factor Rho binds and hydrolyzes ATP using a single class of three sites. *Biochemistry* 40:2276–2281.
Henkin, T. M. 2000. Transcription termination control in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:149–153.
Gusarov, I., and Nudler, E. 1999. The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol. Cell* 3:495–504.

Riboswitches

Barrick, J. E., and Breaker, R. R. 2007. The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol.* 8:R239.
Cheah, M. T., Wachter, A., Sudarsan, N., and Breaker, R. R. 2007. Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature* 447:497–500.
Serganov, A., Huang, L., and Patel, D. J. 2009. Coenzyme recognition and gene regulation by a flavin mononucleotide riboswitch. *Nature* 458:233–237.

RNA Não Codifica

Peculis, B. A. 2002. Ribosome biogenesis: Ribosomal RNA synthesis as a package deal. *Curr. Biol.* 12:R623–R624.
Decatur, W. A., and Fournier, M. J. 2002. rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem. Sci.* 27:344–351.
Hopper, A. K., and Phizicky, E. M. 2003. tRNA transfers to the limelight. *Genes Dev.* 17:162–180.
Weiner, A. M. 2004. tRNA maturation: RNA polymerization without a nucleic acid template. *Curr. Biol.* 14:R883–R885.

Formação de 5'-Cap e Poliadenilação

Shatkin, A. J., and Manley, J. L. 2000. The ends of the affair: Capping and polyadenylation. *Nat. Struct. Biol.* 7:838–842.
Bentley, D. L. 2005. Rules of engagement: Co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:251–256.
Aguilera, A. 2005. Cotranscriptional mRNP assembly: From the DNA to the nuclear pore. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:242–250.
Ro-Choi, T. S. 1999. Nuclear snRNA and nuclear function (discovery of 5' cap structures in RNA). *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expr.* 9:107–158.
Bard, J., Zhelkovsky, A. M., Helmling, S., Earnest, T. N., Moore, C. L., and Bohm, A. 2000. Structure of yeast poly(A) polymerase alone and in complex with 3'-dATP. *Science* 289:1346–1349.
Martin, G., Keller, W., and Doublie, S. 2000. Crystal structure of mammalian poly(A) polymerase in complex with an analog of ATP. *EMBO J.* 19:4193–4203.
Zhao, J., Hyman, L., and Moore, C. 1999. Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: Mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:405–445.
Minvielle-Sebastia, L., and Keller, W. 1999. mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:352–357.

RNA Reguladores Pequenos

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., and Diederichs, S. 2009. Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* 11:228–234.
Ruvkun, G., Wightman, B., and Ha, I. 2004. The 20 years it took to recognize the importance of tiny RNAs. *Cell* 116:S93–S96.

Edição do RNA

Gott, J. M., and Emeson, R. B. 2000. Functions and mechanisms of RNA editing. *Annu. Rev. Genet.* 34:499–531.
Simpson, L., Thiemann, O. H., Savill, N. J., Alfonzo, J. D., and Maslov, D. A. 2000. Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:6986–6993.
Chester, A., Scott, J., Anant, S., and Navaratnam, N. 2000. RNA editing: Cytidine to uridine conversion in apolipoprotein B mRNA.

Biochim. Biophys. Acta 1494:1–3.
Maas, S., and Rich, A. 2000. Changing genetic information through RNA editing. *Bioessays* 22:790–802.

Splicing dos Precursores de mRNA

Caceres, J. F., and Kornblihtt, A. R. 2002. Alternative splicing: Multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet.* 18:186–193.
Faustino, N. A., and Cooper, T. A. 2003. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 17:419–437.
Lou, H., and Gagel, R. F. 1998. Alternative RNA processing: Its role in regulating expression of calcitonin/calcitonin gene-related peptide. *J. Endocrinol.* 156:401–405.
Matlin, A. J., Clark, F., and Smith, C. W. 2005. Understanding alternative splicing: Towards a cellular code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:386–398.
McKie, A. B., McHale, J. C., Keen, T. J., Tarttelin, E. E., Goliath, R., et al. 2001. Mutations in the pre-mRNA splicing factor gene PRPC8 in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP13). *Hum. Mol. Genet.* 10:1555–1562.
Nilsen, T. W. 2003. The spliceosome: The most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays* 25:1147–1149.
Rund, D., and Rachmilewitz, E. 2005. b-Thalassemia. *N. Engl. J. Med.* 353:1135–1146.
Patel, A. A., and Steitz, J. A. 2003. Splicing double: Insights from the second spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:960–970.
Sharp, P. A. 2005. The discovery of split genes and RNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* 30:279–281.
Valadkhan, S., and Manley, J. L. 2001. Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature* 413:701–707.
Zhou, Z., Licklider, L. J., Gygi, S. P., and Reed, R. 2002. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* 419:182–185.
Stark, H., Dube, P., Luhrmann, R., and Kastner, B. 2001. Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* 409:539–542.
Strehler, E. E., and Zacharias, D. A. 2001. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol. Rev.* 81:21–50.
Graveley, B. R. 2001. Alternative splicing: Increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet.* 17:100–107.
Newman, A. 1998. RNA splicing. *Curr. Biol.* 8:R903–R905.
Reed, R. 2000. Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:340–345.
Sleeman, J. E., and Lamond, A. I. 1999. Nuclear organization of pre-mRNA splicing factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:372–377.
Black, D. L. 2000. Protein diversity from alternative splicing: A challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell* 103:367–370.
Collins, C. A., and Guthrie, C. 2000. The question remains: Is the spliceosome a ribozyme? *Nat. Struct. Biol.* 7:850–854.

Auto-*Splicing* e Catálise de RNA

Adams, P. L., Stanley, M. R., Kosek, A. B., Wang, J., and Strobel, S. A. 2004. Crystal structure of a self-splicing group I intron with both exons. *Nature* 430:45–50.
Adams, P. L., Stanley, M. R., Gill, M. L., Kosek, A. B., Wang, J., and Strobel, S. A. 2004. Crystal structure of a group I intron splicing intermediate. *RNA* 10:1867–1887.
Stahley, M. R., and Strobel, S. A. 2005. Structural evidence for a two-metal-ion mechanism of group I intron splicing. *Science* 309:1587–1590.
Carola, C., and Eckstein, F. 1999. Nucleic acid enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:274–283.
Doherty, E. A., and Doudna, J. A. 2000. Ribozyme structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 69:597–615.
Fedor, M. J. 2000. Structure and function of the hairpin ribozyme. *J. Mol. Biol.* 297:269–291.
Hanna, R., and Doudna, J. A. 2000. Metal ions in ribozyme folding and catalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:166–170.
Scott, W. G. 1998. RNA catalysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:720– 726.

Capítulo 30

Literatura Básica

Williamson, J. R. 2009. The ribosome at atomic resolution. *Cell* 139:1041–1043.
Noller, H. F. 2005. RNA structure: Reading the ribosome. *Science* 309:1508–1514.
Dahlberg, A. E. 2001. Ribosome structure: The ribosome in action. *Science* 292:868–869.
Ibba, M., Curnow, A. W., and Söll, D. 1997. Aminoacyl-tRNA synthesis: Divergent routes to a common goal. *Trends Biochem. Sci.* 22:39–42.
Koonin, E. V., and Novozhilov, A. S. 2009. Origin and evolution of the genetic code: The universal enigma. *IUBMB Life* 61:99–111.
Schimmel, P., and Ribas de Pouplana, L. 2000. Footprints of aminoacyl-tRNA synthetases are everywhere. *Trends Biochem. Sci.* 25:207–209.

Livros

Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 2001. Volume 66, *The Ribosome.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Gesteland, R. F., Atkins, J. F., and Cech, T. (Eds.). 2005. *The RNA World,* 3d ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Garrett, R., Douthwaite, S. R., Liljas, A., Matheson, A. T, Moore, P. B., and Noller, H. F. 2000. *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions.* The American Society for Microbiology.

Aminoacil-tRNA Sintetases

Kaminska, M., Havrylenko, S., Decottignies, P., Le Maréchal, P., Negrutskii, B., and Mirande, M. 2009. Dynamic organization of aminoacyl-tRNA synthetase complexes in the cytoplasm of human cells. *J. Biol. Chem.* 284:13746–13754.

Park, S. G., Schimmel, P., and Kim, S. 2008. Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:11043–11049.

Ibba, M., and Söll, D. 2000. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 69:617–650.

Sankaranarayanan, R., Dock-Bregeon, A. C., Rees, B., Bovee, M., Caillet, J., Romby, P., Francklyn, C. S., and Moras, D. 2000. Zinc ion mediated amino acid discrimination by threonyl-tRNA synthetase. *Nat. Struct. Biol.* 7:461–465.

Sankaranarayanan, R., Dock-Bregeon, A. C., Romby, P., Caillet, J., Springer, M., Rees, B., Ehresmann, C., Ehresmann, B., and Moras, D. 1999. The structure of threonyl-tRNA synthetase-tRNA^{Thr} complex enlightens its repressor activity and reveals an essential zinc ion in the active site. *Cell* 97:371–381.

Dock-Bregeon, A., Sankaranarayanan, R., Romby, P., Caillet, J., Springer, M., Rees, B., Francklyn, C. S., Ehresmann, C., and Moras, D. 2000. Transfer RNA-mediated editing in threonyl-tRNA synthetase: The class II solution to the double discrimination problem. *Cell* 103:877–884.

de Pouplana, L. R., and Schimmel, P. 2000. A view into the origin of life: Aminoacyl-tRNA synthetases. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:865–870.

RNA Transportador

Ibba, M., Becker, H. D., Stathopoulos, C., Tumbula, D. L., and Söll, D. 2000. The adaptor hypothesis revisited. *Trends Biochem. Sci.* 25:311–316.

Weisblum, B. 1999. Back to Camelot: Defining the specific role of tRNA in protein synthesis. *Trends Biochem. Sci.* 24:247–250.

Ribossomos e RNA Ribossômicos

Jin, H., Kelley, A. C., Loakes, D., and Ramakrishnan, V. 2010. Structure of the 70S ribosome bound to release factor 2 and a substrate analog provides insights into catalysis of peptide release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:8593–8598.

Rodnina, M. V., and Wintermeyer, W. 2009. Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21:435–443.

Dinman, J. D. 2008. The eukaryotic ribosome: Current status and challenges. *J. Biol. Chem.* 284:11761–11765.

Wen, J.-D., Lancaster, L., Hodges, C., Zeri, A.-C., Yoshimura, S. H., Noller, H. F., Bustamante, C., and Tinoco, I., Jr. 2008. Following translation by single ribosomes one codon at a time. *Nature* 452:598–603.

Korostelev, A., and Noller, H. F. 2007. The ribosome in focus: New structures bring insights. *Trends Biochem. Sci.* 32:434–441.

Brandt, F., Etchells, S. A., Ortiz, J. O., Elcock, A. H., Hartl, F. U., and Baumeister, W. 2009. The native 3D organization of bacterial polysomes. *Cell* 136:261–271.

Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M., and Cate, J. H. 2005. Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* 310:827–834.

Yonath, A., and Franceschi, F. 1998. Functional universality and evolutionary diversity: Insights from the structure of the ribosome. *Structure* 6:679–684.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289:905–920.

Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. 2000. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 407:340–348.

Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vonrhein, C., Hartsch, T., and Ramakrishnan, V. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407:327–339.

Fatores de Iniciação

Søgaard, B., Sørensen, H. P., Mortensen, K. K., and Sperling-Petersen, H. U. 2005. Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:101–123.

Carter, A. P., Clemons, W. M., Jr., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Hartsch, T., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. 2001. Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit. *Science* 291:498–501.

Guenneugues, M., Caserta, E., Brandi, L., Spurio, R., Meunier, S., Pon, C. L., Boelens, R., and Gualerzi, C. O. 2000. Mapping the fMet-tRNA$_f^{Met}$ binding site of initiation factor IF2. *EMBO J.* 19:5233–5240.

Meunier, S., Spurio, R., Czisch, M., Wechselberger, R., Guenneugues, M., Gualerzi, C. O., and Boelens, R. 2000. Structure of the fMet-tRNA$_f^{Met}$-binding domain of *B. stearothermophilus* initiation factor IF2. *EMBO J.* 19:1918–1926.

Fatores de Alongamento

Schuette, J.-C., Murphy, F. V., IV, Kelley, A. C., Weir, J. R., Giesebrecht, J., Connell, S. R., Loerke, J., Mielke, T., Zhang, W., Penczek, P. A., Ramakrishnan, V., and Spahn, C. M. T. 2009. GTPase activation of elongation factor EF-Tu by the ribosome during decoding. *EMBO J.* 28:755–765.

Stark, H., Rodnina, M. V., Wieden, H. J., van Heel, M., and Wintermeyer, W. 2000. Large-scale movement of elongation factor G and extensive conformational change of the ribosome during translocation. *Cell* 100:301–309.

Baensch, M., Frank, R., and Kohl, J. 1998. Conservation of the aminoterminal epitope of elongation factor Tu in Eubacteria and Archaea. *Microbiology* 144:2241–2246.

Krasny, L., Mesters, J. R., Tieleman, L. N., Kraal, B., Fucik, V., Hilgenfeld, R., and Jonak, J. 1998. Structure and expression of elongation factor Tu from *Bacillus stearothermophilus. J. Mol. Biol.* 283:371–381.

Pape, T., Wintermeyer, W., and Rodnina, M. V. 1998. Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the *E. coli* ribosome. *EMBO J.* 17:7490–7497.

Piepenburg, O., Pape, T., Pleiss, J. A., Wintermeyer, W., Uhlenbeck, O. C., and Rodnina, M. V. 2000. Intact aminoacyl-tRNA is required to trigger GTP hydrolysis by elongation factor Tu on the ribosome. *Biochemistry* 39:1734–1738.

Formação da Ligação Peptídica e Translocação

Uemura, S., Aitken, C. E., Korlach, J., Flusberg, B. A., Turner, S. W., and Puglisi, J. D. 2010. Real-time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution. *Nature* 464:1012–1018.

Beringer, M., and. Rodnina, M. V. 2007. The ribosomal peptidyl transferase. *Mol. Cell* 26:311–321.

Yarus, M., and Welch, M. 2000. Peptidyl transferase: Ancient and exiguous. *Chem. Biol.* 7:R187–R190.

Vladimirov, S. N., Druzina, Z., Wang, R., and Cooperman, B. S. 2000. Identification of 50S components neighboring 23S rRNA nucleotides A2448 and U2604 within the peptidyl transferase center of *Escherichia coli* ribosomes. *Biochemistry* 39:183–193.

Frank, J., and Agrawal, R. K. 2000. A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* 406:318–322.

Terminação

Weixlbaumer, A., Jin, H., Neubauer, C., Voorhees, R. M., Petry, S., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. 2008. Insights into translational termination from the structure of RF2 bound to the ribosome. *Science* 322:953–956.

Trobro, S., and Åqvist, S. 2007. A model for how ribosomal release factors induce peptidyl-tRNA cleavage in termination of protein synthesis. *Mol. Cell* 27:758–766.

Korosteleva, A., Asaharaa, H., Lancastera, L., Laurberga, M., Hirschia, A., Zhua, J., Trakhanova, S., Scotta, W. G., and Noller, H. F. 2008. Crystal structure of a translation termination complex formed with release factor RF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:19684– 19689.

Wilson, D. N., Schluenzen, F., Harms, J. M., Yoshida, T., Ohkubo, T., Albrecht, A., Buerger, J., Kobayashi, Y., and Fucini, P. 2005. X-ray crystallography study on ribosome recycling: The mechanism of binding and action of RRF on the 50S ribosomal subunit. *EMBO J.* 24:251–260.

Kisselev, L. L., and Buckingham, R. H. 2000. Translational termination comes of age. *Trends Biochem. Sci.* 25:561–566.

Fidelidade e Revisão

Zaher, H. S., and Green, R. 2009. Quality control by the ribosome following peptide bond formation. *Nature* 457:161–166.

Zaher, H. S., and Green, R. 2009. Fidelity at the molecular level: Lessons from protein synthesis. *Cell* 136:746–762.

Ogle, J. M., and Ramakrishnan, V. 2005. Structural insights into translational fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* 74:129–177.

Ibba, M., and Söll, D. 1999. Quality control mechanisms during translation. *Science* 286:1893–1897.

Rodnina, M. V., and Wintermeyer, W. 2001. Ribosome fidelity: tRNA discrimination, proofreading and induced fit. *Trends Biochem. Sci.* 26:124–130.

Síntese de Proteínas nos Eucariotos

Rhoads, R. E. 2009. eIF4E: New family members, new binding partners, new roles. *J. Biol. Chem.* 284:16711–16715.

Marintchev, A., Edmonds, K. A., Marintcheva, B., Hendrickson, E., Oberer, M., Suzuki, C., Herdy, B., Sonenberg, N., and Wagner, G. 2009. Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. *Cell* 136:447–460.

Fitzgerald, K. D., and Semler, B. L. 2009. Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* 1789:518–528.

Mitchell, S. F., and Lorsch, J. R. 2008. Should I stay or should I go? Eukaryotic translation initiation factors 1 and 1A control start codon recognition. *J. Biol. Chem.* 283:27345–27349.

Amrani, A., Ghosh, S., Mangus, D. A., and Jacobson, A. 2008. Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature* 453:1276–1280.
Sachs, A. B., and Varani, G. 2000. Eukaryotic translation initiation: There are (at least) two sides to every story. *Nat. Struct. Biol.* 7:356–361.
Kozak, M. 1999. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234:187–208.
Bushell, M., Wood, W., Clemens, M. J., and Morley, S. J. 2000. Changes in integrity and association of eukaryotic protein synthesis initiation factors during apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 267:1083–1091.
Das, S., Ghosh, R., and Maitra, U. 2001. Eukaryotic translation initiation factor 5 functions as a GTPase-activating protein. *J. Biol. Chem.* 276:6720–6726.
Lee, J. H., Choi, S. K., Roll-Mecak, A., Burley, S. K., and Dever, T. E. 1999. Universal conservation in translation initiation revealed by human and archaeal homologs of bacterial translation initiation factor IF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:4342–4347.
Pestova, T. V., and Hellen, C. U. 2000. The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:651–674.

Antibióticos e Toxinas

Belova, L., Tenson, T., Xiong, L., McNicholas, P. M., and Mankin, A. S. 2001. A novel site of antibiotic action in the ribosome: Interaction of evernimicin with the large ribosomal subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:3726–3731.
Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Carter, A. P., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. 2000. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* 103:1143–1154.
Porse, B. T., and Garrett, R. A. 1999. Ribosomal mechanics, antibiotics, and GTP hydrolysis. *Cell* 97:423–426.
Lord, M. J., Jolliffe, N. A., Marsden, C. J., Pateman, C. S., Smith, D. S., Spooner, R. A., Watson, P. D., and Roberts, L. M. 2003. Ricin: Mechanisms of toxicity. *Toxicol. Rev.* 22:53–64.

Transporte de Proteína através das Membranas

Janda, C. Y., Li, J., Oubridge, C., Hernández, H., Robinson, C. V., and Nagai, K. 2010. Recognition of a signal peptide by the signal recognition particle. *Nature* 465:507–510.
Cross, B. C. S., Sinning, I., Luirink, J., and High, S. 2009. Delivering proteins for export from the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10:255–264.
Shan, S., Schmid, S. L., and Zhang, X. 2009. Signal recognition particle (SRP) and SRP receptor: A new paradigm for multistate regulatory GTPases. *Biochemistry* 48:6696–6704.
Johnson, A. E. 2009. The structural and functional coupling of two molecular machines, the ribosome and the translocon. *J. Cell Biol.* 185:765–767.
Pool, R. P. 2009. A trans-membrane segment inside the ribosome exit tunnel triggers RAMP4 recruitment to the Sec61p translocase. *J. Cell Biol.* 185:889–902.
Egea, P. F., Stroud, R. M., and Walter, P. 2005. Targeting proteins to membranes: Structure of the signal recognition particle. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15:213–220.
Halic, M., and Beckmann, R. 2005. The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr. Opin. Struct.* Biol.15:116–125.
Doudna, J. A., and Batey, R. T. 2004. Structural insights into the signal recognition particle. *Annu. Rev. Biochem.* 73:539–557.
Schnell, D. J., and Hebert, D. N. 2003. Protein translocons: Multifunctional mediators of protein translocation across membranes. *Cell* 112:491–505.

Capítulo 31

Literatura Básica

Pabo, C. O., and Sauer, R. T. 1984. Protein–DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 53:293–321.
Ptashne, M., Johnson, A. D., and Pabo, C. O. 1982. A genetic switch in a bacterial virus. *Sci. Am.* 247:128–140.
Ptashne, M., Jeffrey, A., Johnson, A. D., Maurer, R., Meyer, B. J., Pabo, C. O., Roberts, T. M., and Sauer, R. T. 1980. How the lambda repressor and Cro work. *Cell* 19:1–11.

Livros

Ptashne, M. 2004. *A Genetic Switch: Phage l Revisited* (3d ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
McKnight, S. L., and Yamamoto, K. R. (Eds.). 1992. *Transcriptional Regulation* (vols. 1 and 2). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L., and Darnell, J., 2008. *Molecular Cell Biology* (6th ed.). W. H. Freeman and Company.

Proteínas que se Ligam ao DNA

Balaeff, A., Mahadevan, L. and Schulten, K. 2004. Structural basis for cooperative DNA binding by CAP and *lac* repressor. *Structure* 12:123–132.

Bell, C. E., and Lewis, M. 2001. The Lac repressor: A second generation of structural and functional studies. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11:19–25.

Lewis, M., Chang, G., Horton, N. C., Kercher, M. A., Pace, H. C., Schumacher, M. A., Brennan, R. G., and Lu, P. 1996. Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science* 271:1247–1254.

Niu, W., Kim, Y., Tau, G., Heyduk, T., and Ebright, R. H. 1996. Transcription activation at class II CAP-dependent promoters: Two interactions between CAP and RNA polymerase. *Cell* 87:1123–1134.

Schultz, S. C., Shields, G. C., and Steitz, T. A. 1991. Crystal structure of a CAP-DNA complex: The DNA is bent by 90 degrees. *Science* 253:1001–1007.

Parkinson, G., Wilson, C., Gunasekera, A., Ebright, Y. W., Ebright, R. E., and Berman, H. M. 1996. Structure of the CAP-DNA complex at 2.5 Å resolution: A complete picture of the protein–DNA interface. *J. Mol. Biol.* 260:395–408.

Busby, S., and Ebright, R. H. 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* 293:199–213.

Somers, W. S., and Phillips, S. E. 1992. Crystal structure of the met repressor-operator complex at 2.8 Å resolution reveals DNA recognition by b-strands. *Nature* 359:387–393.

Circuitos Reguladores Gênicos

Johnson, A. D., Poteete, A. R., Lauer, G., Sauer, R. T., Ackers, G. K., and Ptashne, M. 1981. Lambda repressor and Cro: Components of an efficient molecular switch. *Nature* 294:217–223.

Stayrook, S., Jaru-Ampornpan, P., Ni, J., Hochschild, A., and Lewis, M. 2008. Crystal structure of the lambda repressor and a model for pairwise cooperative operator binding. *Nature* 452:1022–1025.

Arkin, A., Ross, J., and McAdams, H. H. 1998. Stochastic kinetic analysis of developmental pathway bifurcation in phage lambdainfected *Escherichia coli* cells. *Genetics* 149:1633–1648.

Regulação Pós-transcricional

Kolter, R., and Yanofsky, C. 1982. Attenuation in amino acid biosynthetic operons. *Annu. Rev. Genet.* 16:113–134.

Yanofsky, C. 1981. Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* 289:751–758.

Miller, M. B., and Bassler, B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:165–199.

Zhang, R. G., Pappas, T., Brace, J. L., Miller, P. C., Oulmassov, T., Molyneaux, J. M., Anderson, J. C., Bashkin, J. K., Winans, S. C., and Joachimiak, A. 2002. Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature* 417:971–974.

Soberon-Chavez, G., Aguirre-Ramirez, M., and Ordonez, L. 2005. Is *Pseudomonas aeruginosa* only "sensing quorum"? *Crit. Rev. Microbiol.* 31:171–182.

Aspectos Históricos

Lewis, M. 2005. The lac repressor. *C. R. Biol.* 328:521–548.

Jacob, F., and Monod, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3:318–356.

Ptashne, M., and Gilbert, W. 1970. Genetic repressors. *Sci. Am.* 222(6):36–44.

Lwoff, A., and Ullmann, A. (Eds.). 1979. *Origins of Molecular Biology: A Tribute to Jacques Monod.* Academic Press.

Judson, H. 1996. *The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Capítulo 32

Literatura Básica

Kornberg, R. D. 2007. The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:12955–12961.

Pabo, C. O., and Sauer, R. T. 1984. Protein–DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 53:293–321.

Struhl, K. 1989. Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* 14:137–140.

Struhl, K. 1999. Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* 98:1–4.

Korzus, E., Torchia, J., Rose, D. W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E. M., Mullen, T. M., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. 1998. Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279:703–707.

Aalfs, J. D., and Kingston, R. E. 2000. What does "chromatin remodeling" mean? *Trends Biochem. Sci.* 25:548–555.

Livros

McKnight, S. L., and Yamamoto, K. R. (Eds.). 1992. *Transcriptional Regulation* (vols. 1 and 2). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Latchman, D. S. 2004. *Eukaryotic Transcription Factors* (4th ed.). Academic Press.
Wolffe, A. 1992. *Chromatin Structure and Function.* Academic Press.
Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L., and Darnell, J., 2008. *Molecular Cell Biology* (6th ed.). W. H. Freeman and Company.

Cromatina e Remodelagem da Cromatina

Lorch, Y., Maier-Davis, B., and Kornberg, R. D. 2010. Mechanism of chromatin remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:3458–3462.
Tang, L., Nogales, E., and Ciferri, C. 2010. Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 102:122–128.
Jenuwein, T., and Allis, C. D. 2001. Translating the histone code. *Science* 293:1074–1080.
Jiang, C., and Pugh, B. F. 2009. Nucleosome positioning and gene regulation: Advances through genomics. *Nat. Rev. Genet.* 10:161172.
Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129:823–837.
Weintraub, H., Larsen, A., and Groudine, M. 1981. b-Globin-gene switching during the development of chicken embryos: Expression and chromosome structure. *Cell* 24:333–344.
Ren, B., Robert, F., Wyrick, J. J., Aparicio, O., Jennings, E. G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E., Volkert, T. L., Wilson, C. J., Bell, S. P., and Young, R. A. 2000. Genome-wide location and function of DNA-binding proteins. *Science* 290:2306–2309.
Goodrich, J. A., and Tjian, R. 1994. TBP-TAF complexes: Selectivity factors for eukaryotic transcription. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 6:403–409.
Bird, A. P., and Wolffe, A. P. 1999. Methylation-induced repression: Belts, braces, and chromatin. *Cell* 99:451–454.
Cairns, B. R. 1998. Chromatin remodeling machines: Similar motors, ulterior motives. *Trends Biochem. Sci.* 23:20–25.
Albright, S. R., and Tjian, R. 2000. TAFs revisited: More data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene* 242:1–13.
Urnov, F. D., and Wolffe, A. P. 2001. Chromatin remodeling and transcriptional activation: The cast (in order of appearance). *Oncogene* 20:2991–3006.
Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251–260.
Arents, G., and Moudrianakis, E. N. 1995. The histone fold: A ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:11170–11174.
Baxevanis, A. D., Arents, G., Moudrianakis, E. N., and Landsman, D. 1995. A variety of DNA-binding and multimeric proteins contain the histone fold motif. *Nucleic Acids Res.* 23:2685–2691.

Fatores de Transcrição

Green, M. R. 2005. Eukaryotic transcription activation: Right on target. *Mol. Cell* 18:399–402.
Kornberg, R. D. 2005. Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem. Sci.* 30:235–239.
Clements, A., Rojas, J. R., Trievel, R. C., Wang, L., Berger, S. L., and Marmorstein, R. 1999. Crystal structure of the histone acetyltransferase domain of the human PCAF transcriptional regulator bound to coenzyme A. *EMBO J.* 18:3521–3532.
Deckert, J., and Struhl, K. 2001. Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. *Mol. Cell. Biol.* 21:2726–2735.
Dutnall, R. N., Tafrov, S. T., Sternglanz, R., and Ramakrishnan, V. 1998. Structure of the histone acetyltransferase Hat1: A paradigm for the GCN5-related *N*-acetyltransferase superfamily. *Cell* 94:427–438.
Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R., and Pavletich, N. P. 1999. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 401:188–193.
Finnin, M. S., Donigian, J. R., and Pavletich, N. P. 2001. Structure of the histone deacetylase SIR2. *Nat. Struct. Biol.* 8:621–625.
Jacobson, R. H., Ladurner, A. G., King, D. S., and Tjian, R. 2000. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* 288:1422–1425.
Rojas, J. R., Trievel, R. C., Zhou, J., Mo, Y., Li, X., Berger, S. L., Allis, C. D., and Marmorstein, R. 1999. Structure of *Tetrahymena* GCN5 bound to coenzyme A and a histone H3 peptide. *Nature* 401:93–98.

Células-tronco Pluripotentes Induzidas

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872.
Takahashi, K., and Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined

factors. *Cell* 126:663–676.
Park, I. H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G. Q. 2008. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134:877–886.
Yamanaka, S. 2009. A fresh look at iPS cells. *Cell* 137:13–17.
Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I., and Thomson, J. A. 2009. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324:797–801.

Receptores Nucleares de Hormônio

Downes, M., Verdecia, M. A., Roecker, A. J., Hughes, R., Hogenesch, J. B., Kast-Woelbern, H. R., Bowman, M. E., Ferrer, J. L., Anisfeld, A. M., Edwards, P. A., Rosenfeld, J. M., Alvarez, J. G., Noel, J. P., Nicolaou, K. C., and Evans, R. M. 2003. A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol. Cell* 11:1079–1092.
Evans, R. M. 2005. The nuclear receptor superfamily: A Rosetta stone for physiology. *Mol. Endocrinol.* 19:1429–1438.
Xu, W., Cho, H., Kadam, S., Banayo, E. M., Anderson, S., Yates, J. R., 3d, Emerson, B. M., and Evans, R. M. 2004. A methylationmediator complex in hormone signaling. *Genes Dev.* 18:144–156.
Evans, R. M. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889–895.
Yamamoto, K. R. 1985. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet.* 19:209–252.
Tanenbaum, D. M., Wang, Y., Williams, S. P., and Sigler, P. B. 1998. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:5998–6003.
Schwabe, J. W., Chapman, L., Finch, J. T., and Rhodes, D. 1993. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: How receptors discriminate between their response elements. *Cell* 75:567–578.
Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., and Greene, G. L. 1998. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95:927–937.
Collingwood, T. N., Urnov, F. D., and Wolffe, A. P. 1999. Nuclear receptors: Coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J. Mol. Endocrinol.* 23:255–275.

Regulação Pós-transcricional

Rouault, T. A., Stout, C. D., Kaptain, S., Harford, J. B., and Klausner, R. D. 1991. Structural relationship between an iron-regulated RNA-binding protein (IRE-BP) and aconitase: Functional implications. *Cell* 64:881–883.
Klausner, R. D., Rouault, T. A., and Harford, J. B. 1993. Regulating the fate of mRNA: The control of cellular iron metabolism. *Cell* 72:19–28.
Gruer, M. J., Artymiuk, P. J., and Guest, J. R. 1997. The aconitase family: Three structural variations on a common theme. *Trends Biochem. Sci.* 22:3–6.
Theil, E. C. 1994. Iron regulatory elements (IREs): A family of mRNA non-coding sequences. *Biochem. J.* 304:1–11.

MicroRNA

Ruvkun, G. 2008. The perfect storm of tiny RNAs. *Nat. Med.* 14:1041–1045.
Sethupathy, P., and Collins, F. S. 2008. MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends Genet.* 24:489–497.
Adams, B. D., Cowee, D. M., and White, B. A. 2009. The role of miR-206 in the epidermal growth factor (EGF) induced repression of estrogen receptor-a (ERa) signaling and a luminal phenotype in MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 23:1215–1230.
Jegga, A. G., Chen, J., Gowrisankar, S., Deshmukh, M. A., Gudivada, R., Kong, S., Kaimal, V., and Aronow, B. J. 2007. GenomeTrafac: A whole genome resource for the detection of transcription factor binding site clusters associated with conventional and microRNA encoding genes conserved between mouse and human gene orthologs. *Nucleic Acids Res.* 35:D116-D121.

Capítulo 33

Literatura Básica

Axel, R. 1995. The molecular logic of smell. *Sci. Am.* 273(4):154–159.
Dulac, C. 2000. The physiology of taste, vintage 2000. *Cell* 100:607–610.
Yarmolinsky, D. A., Zuker, C. S., and Ryba, N. J. (2009) Common sense about taste: From mammals to insects. *Cell* 139:234–244.
Stryer, L. 1996. Vision: From photon to perception. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:557–559.
Hudspeth, A. J. 1989. How the ear's works work. *Nature* 341:397–404.

Olfação

Buck, L., and Axel, R.1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* 65:175–187.

Saito, H., Chi, Q., Zhuang, H., Matsunami, H., and Mainland, J. D. 2009. Odor coding by a mammalian receptor repertoire. *Sci. Signal.* 2:ra9.
Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., and Buck, L. B. 1999. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96:713–723.
Zou, D. J., Chesler, A., and Firestein, S. 2009. How the olfactory bulb got its glomeruli: A just so story? *Nat. Rev. Neurosci.* 10:611–618.
De la Cruz, O., Blekhman, R., Zhang, X., Nicolae, D., Firestein, S., and Gilad, Y. 2009. A signature of evolutionary constraint on a subset of ectopically expressed olfactory receptor genes. *Mol. Biol. Evol.* 26:491–494.
Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., and Axel, R. 1996. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87:675–686.
Buck, L. 2005. Unraveling the sense of smell (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44:6128–6140.
Belluscio, L., Gold, G. H., Nemes, A., and Axel, R. 1998. Mice deficient in $G_{(olf)}$ are anosmic. *Neuron* 20:69–81.
Vosshall, L. B., Wong, A. M., and Axel, R. 2000. An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* 102:147–159.
Lewcock, J. W., and Reed, R. R. 2003. A feedback mechanism regulates monoallelic odorant receptor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:1069–1074.
Reed, R. R. 2004. After the holy grail: Establishing a molecular mechanism for mammalian olfaction. *Cell* 116:329–336.

Paladar

Chandrashekar, J., Yarmolinsky, D., von Buchholtz, L., Oka, Y., Sly, W., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. 2009. The taste of carbonation. *Science* 326:443–445.
Zhao, G. Q., Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N. J. P., and Zuker, C. S. 2003. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115:255–266.
Herness, M. S., and Gilbertson, T. A. 1999. Cellular mechanisms of taste transduction. *Annu. Rev. Physiol.* 61:873–900.
Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. 2000. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100:693–702.
Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C. S., and Ryba, N. J. 2000. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* 100:703–711.
Mano, I., and Driscoll, M. 1999. DEG/ENaC channels: A touchy superfamily that watches its salt. *Bioessays* 21:568–578.
Benos, D. J., and Stanton, B. A. 1999. Functional domains within the degenerin/epithelial sodium channel (Deg/ENaC) superfamily of ion channels. *J. Physiol. (Lond.)* 520(part 3):631–644.
McLaughlin, S. K., McKinnon, P. J., and Margolskee, R. F. 1992. Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature* 357:563–569.
Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. 2001. Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106:381–390.

Visão

Stryer, L. 1988. Molecular basis of visual excitation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 53:283–294.
Jastrzebska, B., Tsybovsky, Y., and Palczewski, K. 2010. Complexes between photoactivated rhodopsin and transducin: Progress and questions. *Biochem. J.* 428:1–10.
Wald, G. 1968. The molecular basis of visual excitation. *Nature* 219:800–807.
Ames, J. B., Dizhoor, A. M., Ikura, M., Palczewski, K., and Stryer, L. 1999. Three-dimensional structure of guanylyl cyclase activating protein-2, a calcium-sensitive modulator of photoreceptor guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 274:19329–19337.
Nathans, J. 1994. In the eye of the beholder: Visual pigments and inherited variation in human vision. *Cell* 78:357–360.
Nathans, J. 1999. The evolution and physiology of human color vision: Insights from molecular genetic studies of visual pigments. *Neuron* 24:299–312.
Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., LeTrong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., and Miyano, M. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289:739–745.
Filipek, S, Teller, D. C., Palczewski, K., and Stemkamp, R. 2003. The crystallographic model of rhodopsin and its use in studies of other G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32:375–397.

Audição

Furness, D. N., Hackney, C. M., and Evans, M. G. 2010. Localisation of the mechanotransducer channels in mammalian cochlear hair cells provides clues to their gating. *J. Physiol.* 588:765–772.
Lim, K., and Park, S. 2009. A mechanical model of the gating spring mechanism of stereocilia. *J. Biomech.* 42:2158–2164.
Siemens, J., Lillo, C., Dumont, R. A., Reynolds, A., Williams, D. S., Gillespie, P. G., and Muller, U. 2004. Cadherin 23 is a component of the tip link in hair-cell stereocilia. *Nature* 428:950–955.
Spinelli, K. J., and Gillespie, P. G. 2009. Bottoms up: Transduction channels at tip link bases. *Nat. Neurosci.* 12:529–530.

Hudspeth, A. J. 1997. How hearing happens. *Neuron* 19:947–950.
Pickles, J. O., and Corey, D. P. 1992. Mechanoelectrical transduction by hair cells. *Trends Neurosci.* 15:254–259.
Walker, R. G., Willingham, A. T., and Zuker, C. S. 2000. A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science* 287:2229–2234.
Hudspeth, A. J., Choe, Y., Mehta, A. D., and Martin, P. 2000. Putting ion channels to work: Mechanoelectrical transduction, adaptation, and amplification by hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:11765–11772.

Tato e Sensação de Dor

Myers, B. R., Bohlen, C. J., and Julius, D. 2008. A yeast genetic screen reveals a critical role for the pore helix domain in TRP channel gating. *Neuron* 58:362–373.
Lishko, P. V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C. B., and Gaudet, R. 2007. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* 54:905–918.
Franco-Obregon, A., and Clapham, D. E. 1998. Touch channels sense blood pressure. *Neuron* 21:1224–1226.
Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., and Julius, D. 1997. The capsaicin receptor: A heatactivated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824.
Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I., and Julius, D. 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531–543.
Caterina, M. J., and Julius, D. 1999. Sense and specificity: A molecular identity for nociceptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9:525–530.
Clapham, D. E. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517–524.

Capítulo 34

Literatura Básica

Nossal, G. J. V. 1993. Life, death, and the immune system. *Sci. Am.* 269(3):53–62.
Tonegawa, S. 1985. The molecules of the immune system. *Sci. Am.* 253(4):122–131.
Leder, P. 1982. The genetics of antibody diversity. *Sci. Am.* 246(5):102–115.
Bromley, S. K., Burack, W. R., Johnson, K. G., Somersalo, K., Sims, T. N., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L. 2001. The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* 19:375–396.

Livros

Kindt, T. J., Goldsby, R. A., and Osborne, B. A. 2007. *Kuby Immunology* (6th ed.). W. H. Freeman and Company.
Abbas, A. K., and Lichtman, A. H. 2003. *Cellular and Molecular Immunology* (5th ed). Saunders.
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1989. Volume 54. Immunological Recognition.
Nisinoff, A. 1985. *Introduction to Molecular Immunology* (2d ed.). Sinauer.
Weir, D. M. (Ed.). 1996. *Handbook of Experimental Immunology* (5th ed.). Oxford University Press.
Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. 2005. *Immunobiology* (6th ed.). Garland Science.

Sistema Imune Inato

Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197–216.
Choe, J., Kelker, M. S., and Wilson, I. A. 2005. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* 309:581–585.
Khalturin, K., Panzer, Z., Cooper, M. D., and Bosch, T. C. 2004. Recognition strategies in the innate immune system of ancestral chordates. *Mol. Immunol.* 41:1077–1087.
Beutler, B., and Rietschel, E. T. 2003. Innate immune sensing and its roots: The story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* 3:169–176.
Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J. L., and Tong, L. 2000. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 408:111–115.

Estrutura dos Anticorpos e Complexo Anticorpo-Antígeno

Davies, D. R., Padlan, E. A., and Sheriff, S. 1990. Antibody-antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 59:439–473.
Poljak, R. J. 1991. Structure of antibodies and their complexes with antigens. *Mol. Immunol.* 28:1341–1345.
Davies, D. R., and Cohen, G. H. 1996. Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:7–12.
Marquart, M., Deisenhofer, J., Huber, R., and Palm, W. 1980. Crystallographic refinement and atomic models of the intact immunoglobulin molecule Kol and its antigen-binding fragment at 3.0 Å and 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 141:369–391.
Silverton, E. W., Navia, M. A., and Davies, D. R. 1977. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:5140–5144.
Padlan, E. A., Silverton, E. W., Sheriff, S., Cohen, G. H., Smith, G. S., and Davies, D. R. 1989. Structure of an antibody-antigen complex:

Crystal structure of the HyHEL-10 Fab lysozyme complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:5938–5942.
Rini, J., Schultze-Gahmen, U., and Wilson, I. A. 1992. Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition. *Science* 255:959–965.
Fischmann, T. O., Bentley, G. A., Bhat, T. N., Boulot, G., Mariuzza, R. A., Phillips, S. E., Tello, D., and Poljak, R. J. 1991. Crystallographic refinement of the three-dimensional structure of the FabD1.3-lysozyme complex at 2.5-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 266:12915–12920.
Burton, D. R. 1990. Antibody: The flexible adaptor molecule. *Trends Biochem. Sci.* 15:64–69.
Saphire, E. O., Parren P. W., Pantophlet, R., Zwick, M. B., Morris, G. M., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Stanfield, R. L., Burton, D. R., and Wilson, I. A. 2001. Crystal structure of a neutralizing human IgG against HIV-1: A template for vaccine design. *Science* 293:1155–1159.
Calarese, D. A., Scanlan, C. N., Zwick, M. B., Deechongkit, S., Mimura, Y., Kunert R., Zhu, P., Wormald, M. R., Stanfield, R. L., Roux, K. H., Kelly, J. W., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Katinger, H., Burton, D. R., and Wilson, I. A. 2003. Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* 300:2065–2071.

Geração da Diversidade

Tonegawa, S. 1988. Somatic generation of immune diversity. *Biosci. Rep.* 8:3–26.
Honjo, T., and Habu, S. 1985. Origin of immune diversity: Genetic variation and selection. *Annu. Rev. Biochem.* 54:803–830.
Gellert, M., and McBlane, J. F. 1995. Steps along the pathway of VDJ recombination. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 347:43–47.
Harris, R. S., Kong, Q., and Maizels, N. 1999. Somatic hypermutation and the three R's: Repair, replication and recombination. *Mutat. Res.* 436:157–178.
Lewis, S. M., and Wu, G. E. 1997. The origins of V(D)J recombination. *Cell* 88:159–162.
Ramsden, D. A., van Gent, D. C., and Gellert, M. 1997. Specificity in V(D)J recombination: New lessons from biochemistry and genetics. *Curr. Opin. Immunol.* 9:114–120.
Roth, D. B., and Craig, N. L. 1998. VDJ recombination: A transposase goes to work. *Cell* 94:411–414.
Sadofsky, M. J. 2001. The RAG proteins in V(D)J recombination: More than just a nuclease. *Nucleic Acids Res.* 29:1399–1409.

Proteínas do MHC e Processamento de Antígeno

Bjorkman, P. J., and Parham, P. 1990. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 59:253–288.
Goldberg, A. L., and Rock, K. L. 1992. Proteolysis, proteasomes, and antigen presentation. *Nature* 357:375–379.
Madden, D. R., Gorga, J. C., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. 1992. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight binding to MHC. *Cell* 70:1035–1048.
Fremont, D. H., Matsumura, M., Stura, E. A., Peterson, P. A., and Wilson, I. A. 1992. Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb. *Science* 257:880–881.
Matsumura, M., Fremont, D. H., Peterson, P. A., and Wilson, I. A. 1992. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I. *Science* 257:927–934.
Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLADR1. *Nature* 364:33–39.
Saper, M. A., Bjorkman, P. J., and Wiley, D. C. 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219:277–319.
Madden, D. R., Gorga, J. C., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. 1991. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* 353:321–325.
Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T., and Diedrich, G. 1999. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol. Rev.* 172:21–28.
Madden, D. R., Garboczi, D. N., and Wiley, D. C. 1993. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: A comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell* 75: 693–708.

Receptores de Células T e Complexos de Sinalização

Hennecke, J., and Wiley, D. C. 2001. T-cell receptor-MHC interactions up close. *Cell* 104:1–4.
Ding, Y. H., Smith, K. J., Garboczi, D. N., Utz, U., Biddison, W. E., and Wiley, D. C. 1998. Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids. *Immunity* 8:403–411.
Reinherz, E. L., Tan, K., Tang, L., Kern, P., Liu, J., Xiong, Y., Hussey, R. E., Smolyar, A., Hare, B., Zhang, R., Joachimiak, A., Chang, H. C., Wagner, G., and Wang, J. 1999. The crystal structure of a T-cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science* 286:1913–1921.

Davis, M. M., and Bjorkman, P. J. 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334:395–402.
Cochran, J. R., Cameron, T. O., and Stern, L. J. 2000. The relationship of MHC-peptide binding and T cell activation probed using chemically defined MHC class II oligomers. *Immunity* 12:241–250.
Garcia, K. C., Teyton, L., and Wilson, I. A. 1999. Structural basis of T cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 17:369–397.
Garcia, K. C., Degano, M., Stanfield, R. L., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Teyton, L. A., and Wilson, I. A. 1996. An αβ T-cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274:209–219.
Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E., Wiley, D. C. 1996. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384:134–141.
Gaul, B. S., Harrison, M. L., Geahlen, R. L., Burton, R. A., and Post, C. B. 2000. Substrate recognition by the Lyn protein-tyrosine kinase: NMR structure of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif signaling region of the B cell antigen receptor. *J. Biol. Chem.* 275:16174–16182.
Kern, P. S., Teng, M. K., Smolyar, A., Liu, J. H., Liu, J., Hussey, R. E., Spoerl, R., Chang, H. C., Reinherz, E. L., and Wang, J. H. 1998. Structural basis of CD8 coreceptor function revealed by crystallographic analysis of a murine CD8 αβ ectodomain fragment in complex with H-2Kb. *Immunity* 9:519–530.
Konig, R., Fleury, S., and Germain, R. N. 1996. The structural basis of CD4-MHC class II interactions: Coreceptor contributions to T cell receptor antigen recognition and oligomerization-dependent signal transduction. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 205:19–46.
Davis, M. M., Boniface, J. J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., and Chien, Y. 1998. Ligand recognition by αβ T-cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 16:523–544.
Janeway, C. J. 1992. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 10:645–674.
Podack, E. R., and Kupfer, A. 1991. T-cell effector functions: Mechanisms for delivery of cytotoxicity and help. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:479–504.
Davis, M. M. 1990. T cell receptor gene diversity and selection. *Annu. Rev. Biochem.* 59:475–496.
Leahy, D. J., Axel, R., and Hendrickson, W. A. 1992. Crystal structure of a soluble form of the human T cell coreceptor CD8 at 2.6 Å resolution. *Cell* 68:1145–1162.
Bots, M., and Medema, J. P. 2006. Granzymes at a glance. *J. Cell. Sci.* 119:5011–5014.
Lowin, B., Hahne, M., Mattmann, C., and Tschopp, J. 1994. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370:650–652.
Rudolph, M. G., and Wilson, I. A. 2002. The specificity of TCR/pMHC interaction. *Curr. Opin. Immunol.* 14:52–65.

HIV e AIDS

Fauci, A. S. 1988. The human immunodeficiency virus: Infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 239:617–622.
Gallo, R. C., and Montagnier, L. 1988. AIDS in 1988. *Sci. Am.* 259(4):41–48.
Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., and Hendrickson, W. A. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393:648–659.

Vacinas

Johnston, M. I. and Fauci, A. S. 2007. An HIV vaccine–evolving concepts. *N. Engl. J. Med.* 356:2073—2081.
Burton, D. R., Desrosiers, R. C., Doms, R. W., Koff, W. C., Kwong, P. D., Moore, J. P., Nabel, G. J., Sodroski, J., Wilson, I. A., and Wyatt, R. T. 2004. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nature Immunol.* 5:233–236.
Ada, G. 2001. Vaccines and vaccination. *N. Engl. J. Med.* 345:1042–1053.
Behbehani, A. M. 1983. The smallpox story: Life and death of an old disease. *Microbiol. Rev.* 47:455–509.

Descoberta dos Conceitos Principais

Ada, G. L., and Nossal, G. 1987. The clonal selection theory. *Sci. Am.* 257(2):62–69.
Porter, R. R. 1973. Structural studies of immunoglobulins. *Science* 180:713–716.
Edelman, G. M. 1973. Antibody structure and molecular immunology. *Science* 180:830–840.
Kohler, G. 1986. Derivation and diversification of monoclonal antibodies. *Science* 233:1281–1286.
Milstein, C. 1986. From antibody structure to immunological diversification of immune response. *Science* 231:1261–1268.
Janeway, C. A., Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 54:1–13.
Jerne, N. K. 1971. Somatic generation of immune recognition. *Eur. J. Immunol.* 1:1–9.

Capítulo 35

Literatura Básica

Gennerich, A., and Vale, R. D. 2009. Walking the walk: How kinesin and dynein coordinate their steps. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21:59–67.

Vale, R. D. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112:467–480.

Vale, R. D., and Milligan, R. A. 2000. The way things move: Looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* 288:88–95.

Vale, R. D. 1996. Switches, latches, and amplifiers: Common themes of G proteins and molecular motors. *J. Cell Biol.* 135:291–302.

Mehta, A. D., Rief, M., Spudich, J. A., Smith, D. A., and Simmons, R. M. 1999. Single-molecule biomechanics with optical methods. *Science* 283:1689–1695.

Schuster, S. C., and Khan, S. 1994. The bacterial flagellar motor. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:509–539.

Livros

Howard, J. 2001. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytosketon.* Sinauer.

Squire, J. M. 1986. *Muscle Design, Diversity, and Disease.* Benjamin Cummings.

Pollack, G. H., and Sugi, H. (Eds.). 1984. *Contractile Mechanisms in Muscle.* Plenum.

Miosina e Actina

Lorenz, M., and Holmes, K. C. 2010. The actin-myosin interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:12529–12534.

Yang, Y., Gourinath, S., Kovacs, M., Nyitray, L., Reutzel, R., Himmel, D. M., O'Neall-Hennessey, E., Reshetnikova, L., Szent-Györgyi, A. G., Brown, J. H., and Cohen, C. 2007. Rigor-like structures from muscle myosins reveal key mechanical elements in the transduction pathways of this allosteric motor. *Structure* 15:553–564.

Himmel, D. M., Mui, S., O'Neall-Hennessey, E., Szent-Györgyi, A. G., and Cohen, C. 2009. The on-off switch in regulated myosins: Different triggers but related mechanisms. *J. Mol. Biol.* 394:496–505.

Houdusse, A., Gaucher, J. F., Krementsova, E., Mui, S., Trybus, K. M., and Cohen, C. 2006. Crystal structure of apo-calmodulin bound to the first two IQ motifs of myosin V reveals essential recognition features. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:19326–19331.

Li, X. E., Holmes, K. C., Lehman, W., Jung, H., and Fischer, S. 2010. The shape and flexibility of tropomyosin coiled coils: Implications for actin filament assembly and regulation. *J. Mol. Biol.* 395:327–339.

Fischer, S., Windshugel, B., Horak, D., Holmes, K. C., and Smith, J. C. 2005. Structural mechanism of the recovery stroke in the myosin molecular motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:6873–6878.

Holmes, K. C., Angert, I., Kull, F. J., Jahn, W., and Schroder, R. R. 2003. Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide. *Nature* 425:423–427.

Holmes, K. C., Schroder, R. R., Sweeney, H. L., and Houdusse, A. 2004. The structure of the rigor complex and its implications for the power stroke. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 359:1819–1828.

Purcell, T. J., Morris, C., Spudich, J. A., and Sweeney, H. L. 2002. Role of the lever arm in the processive stepping of myosin V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:14159–14164.

Purcell, T. J., Sweeney, H. L., and Spudich, J. A. 2005. A force-dependent state controls the coordination of processive myosin V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:13873–13878.

Holmes, K. C. 1997. The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction. *Curr. Biol.* 7:R112–R118.

Berg, J. S., Powell, B. C., and Cheney, R. E. 2001. A millennial myosin census. *Mol. Biol. Cell* 12:780–794.

Houdusse, A., Kalabokis, V. N., Himmel, D., Szent-Györgyi, A. G., and Cohen, C. 1999. Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: A novel conformation of the myosin head. *Cell* 97:459–470.

Houdusse, A., Szent-Györgyi, A. G., and Cohen, C. 2000. Three conformational states of scallop myosin S1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:11238–11243.

Uyeda, T. Q., Abramson, P. D., and Spudich, J. A. 1996. The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:4459–4464.

Mehta, A. D., Rock, R. S., Rief, M., Spudich, J. A., Mooseker, M. S., and Cheney, R. E. 1999. Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* 400:590–593.

Otterbein, L. R., Graceffa, P., and Dominguez, R. 2001. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science* 293:708–711.

Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., and Kabsch, W. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature* 347:44–49.

Schutt, C. E., Myslik, J. C., Rozycki, M. D., Goonesekere, N. C., and Lindberg, U. 1993. The structure of crystalline profilin-β-actin. *Nature* 365:810–816.

van den Ent, F., Amos, L. A., and Lowe, J. 2001. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* 413:39–44.

Schutt, C. E., and Lindberg, U. 1998. Muscle contraction as a Markov process I: Energetics of the process. *Acta Physiol. Scand.* 163:307–323.

Rief, M., Rock, R. S., Mehta, A. D., Mooseker, M. S., Cheney, R. E., and Spudich, J. A. 2000. Myosin-V stepping kinetics: A molecular model for processivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:9482–9486.

Friedman, T. B., Sellers, J. R., and Avraham, K. B. 1999. Unconventional myosins and the genetics of hearing loss. *Am. J. Med. Genet.* 89:147–157.

Cinesina, Dineína e Microtúbulos

Yildiz, A., Tomishige, M., Gennerich, A., and Vale, R. D. 2008. Intramolecular strain coordinates kinesin stepping behavior along microtubules. *Cell* 134:1030–1041.

Yildiz, A., Tomishige, M., Vale, R. D., and Selvin, P. R. 2004. Kinesin walks hand-over-hand. *Science* 303:676–678.

Rogers, G. C., Rogers, S. L., Schwimmer, T. A., Ems-McClung, S. C., Walczak, C. E., Vale, R. D., Scholey, J. M., and Sharp, D. J. 2004. Two mitotic kinesins cooperate to drive sister chromatid separation during anaphase. *Nature* 427:364–370.

Vale, R. D., and Fletterick, R. J. 1997. The design plan of kinesin motors. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13:745–777.

Kull, F. J., Sablin, E. P., Lau, R., Fletterick, R. J., and Vale, R. D. 1996. Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature* 380:550–555.

Kikkawa, M., Sablin, E. P., Okada, Y., Yajima, H., Fletterick, R. J., and Hirokawa, N. 2001. Switch-based mechanism of kinesin motors. *Nature* 411:439–445.

Wade, R. H., and Kozielski, F. 2000. Structural links to kinesin directionality and movement. *Nat. Struct. Biol.* 7:456–460.

Yun, M., Zhang, X., Park, C. G., Park, H. W., and Endow, S. A. 2001. A structural pathway for activation of the kinesin motor ATPase. *EMBO J.* 20:2611–2618.

Kozielski, F., De Bonis, S., Burmeister, W. P., Cohen-Addad, C., and Wade, R. H. 1999. The crystal structure of the minus-end-directed microtubule motor protein ncd reveals variable dimer conformations. *Struct. Fold. Des.* 7:1407–1416.

Lowe, J., Li, H., Downing, K. H., and Nogales, E. 2001. Refined structure of αβ-tubulin at 3.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 313:1045–1057.

Nogales, E., Downing, K. H., Amos, L. A., and Lowe, J. 1998. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat. Struct. Biol.* 5:451–458.

Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., Setou, M., Nakagawa, T., Takeda, S., Yang, H. W., Terada, S., Nakata, T., Takei, Y., Saito, M., Tsuji, S., Hayashi, Y., and Hirokawa, N. 2001. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bβ. *Cell* 105:587–597.

Asai, D. J., and Koonce, M. P. 2001. The dynein heavy chain: Structure, mechanics and evolution. *Trends Cell Biol.* 11:196–202.

Mocz, G., and Gibbons, I. R. 2001. Model for the motor component of dynein heavy chain based on homology to the AAA family of oligomeric ATPases. *Structure* 9:93–103.

Movimento Bacteriano e Quimiotaxia

Baker, M. D., Wolanin, P. M., and Stock, J. B. 2006. Systems biology of bacterial chemotaxis. *Curr. Opin. Microbiol.* 9:187–192.

Wolanin, P. M., Baker, M. D., Francis, N. R., Thomas, D. R., DeRosier, D. J., and Stock, J. B. 2006. Self-assembly of receptor/ signaling complexes in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:14313–14318.

Sowa, Y., Rowe, A. D., Leake, M. C., Yakushi, T., Homma, M., Ishijima, A., and Berry, R. M. 2005. Direct observation of steps in rotation of the bacterial flagellar motor. *Nature* 437:916–919.

Berg, H. C. 2000. Constraints on models for the flagellar rotary motor. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 355:491–501.

DeRosier, D. J. 1998. The turn of the screw: The bacterial flagellar motor. *Cell* 93:17–20.

Ryu, W. S., Berry, R. M., and Berg, H. C. 2000. Torque-generating units of the flagellar motor of *Escherichia coli* have a high duty ratio. *Nature* 403:444–447.

Lloyd, S. A., Whitby, F. G., Blair, D. F., and Hill, C. P. 1999. Structure of the C-terminal domain of FliG, a component of the rotor in the bacterial flagellar motor. *Nature* 400:472–475.

Purcell, E. M. 1977. Life at low Reynolds number. *Am. J. Physiol.* 45:3–11.

Macnab, R. M., and Parkinson, J. S. 1991. Genetic analysis of the bacterial flagellum. *Trends Genet.* 7:196–200.

Aspectos Históricos

Huxley, H. E. 1965. The mechanism of muscular contraction. *Sci. Am.* 213(6):18–27.

Summers, K. E., and Gibbons, I. R. 1971. ATP-induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of sea-urchin sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68:3092–3096.

Macnab, R. M., and Koshland, D. E., Jr. 1972. The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69:2509–2512.

Taylor, E. W. 2001. 1999 E. B. Wilson lecture: The cell as molecular machine. *Mol. Biol. Cell* 12:251–254.

Capítulo 36

Livros

Kenakin, T. P. 2006. *A Pharmacology Primer: Theory, Applications, and Methods* (2d ed.). Academic Press.

Brunton, L., Lazo, J., and Parker, K. 2005. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (11th ed.). McGraw-Hill Professional.

Walsh, C. T., and Schwartz-Bloom, R. D. 2004. *Levine's Pharmacology: Drug Actions and Reactions* (7th ed.). Taylor and Francis Group.

Silverman, R. B. 2004. *Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action.* Academic Press.

Walsh, C. 2003. *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance.* ASM Press.

ADME e Toxicidade

Caldwell, J., Gardner, I., and Swales, N. 1995. An introduction to drug disposition: The basic principles of absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Toxicol. Pathol.* 23:102–114.

Lee, W., and Kim, R. B. 2004. Transporters and renal drug elimination. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44:137–166.

Lin, J., Sahakian, D. C., de Morais, S. M., Xu, J. J., Polzer, R. J., and Winter, S. M. 2003. The role of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity in drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* 3:1125–1154.

Poggesi, I. 2004. Predicting human pharmacokinetics from preclinical data. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 7:100–111.

Casos Históricos

Flower, R. J. 2003. The development of COX2 inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:179–191.

Tobert, J. A. 2003. Lovastatin and beyond: The history of the HMGCoA reductase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:517–526.

Vacca, J. P., Dorsey, B. D., Schleif, W. A., Levin, R. B., McDaniel, S. L., Darke, P. L., Zugay, J., Quintero, J. C., Blahy, O. M., Roth, E., et al. 1994. L-735,524: An orally bioavailable human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:4096–4100.

Wong, S., and Witte, O. N. 2004. The BCR-ABL story: Bench to bedside and back. *Annu. Rev. Immunol.* 22:247–306.

Planejamento de Fármacos com Base na Estrutura

Kuntz, I. D. 1992. Structure-based strategies for drug design and discovery. *Science* 257:1078–1082.

Dorsey, B. D., Levin, R. B., McDaniel, S. L., Vacca, J. P., Guare, J. P., Darke, P. L., Zugay, J. A., Emini, E. A., Schleif, W. A., Quintero, J. C., et al. 1994. L-735,524: The design of a potent and orally bioavailable HIV protease inhibitor. *J. Med. Chem.* 37:3443–3451.

Chen, Z., Li, Y., Chen, E., Hall, D. L., Darke, P. L., Culberson, C., Shafer, J. A., and Kuo, L. C. 1994. Crystal structure at 1.9-Å resolution of human immunodeficiency virus (HIV) II protease complexed with L-735,524, an orally bioavailable inhibitor of the HIV proteases. *J. Biol. Chem.* 269:26344–26348.

Química Combinatória

Baldwin, J. J. 1996. Design, synthesis and use of binary encoded synthetic chemical libraries. *Mol. Divers.* 2:81–88.

Burke, M. D., Berger, E. M., and Schreiber, S. L. 2003. Generating diverse skeletons of small molecules combinatorially. *Science* 302:613–618.

Edwards, P. J., and Morrell, A. I. 2002. Solid-phase compound library synthesis in drug design and development. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5:594–605.

Genômica

Zambrowicz, B. P., and Sands, A. T. 2003. Knockouts model the 100 best-selling drugs: Will they model the next 100? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:38–51.

Salemme, F. R. 2003. Chemical genomics as an emerging paradigm for postgenomic drug discovery. *Pharmacogenomics* 4:257–267.

Michelson, S., and Joho, K. 2000. Drug discovery, drug development and the emerging world of pharmacogenomics: Prospecting for information in a data-rich landscape. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2:651–654.

Weinshilboum, R., and Wang, L. 2004. Pharmacogenomics: Bench to bedside. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3:739–748.

Índice Alfabético

A

α-amilase, 458
α-aminoácido, 29
α-cetoglutarato desidrogenase, 511
A-DNA, 117
ABC, 380
Absorção, 1039
  - distribuição, metabolismo e excreção, 1040
Abzyme, 246
Ação
  - da célula T auxiliar, 1006
  - do microRNA, 959
Ação do tampão, 17
Acetil-CoA, 501
  - carboxilase, 661, 671
Acetilcolina, 391
Ácido(s)
  - acetilsalicílico, 1048
  - *all-trans*-retinoico, 952
  - aspártico, 33
  - bromocarboxílicos, 969
  - carboxílicos, 969
  - desoxirribonucleico (DNA), 4, 112
  - dicarboxílicos, 969
  - fólico, 761
  - glutâmico, 33
  - graxo(s), 60, 348
    - - metabolismo dos
      - - - acetil-CoA carboxilase, 661
      - - - acil adenilato, 649
      - - - araquidonato, 668
      - - - carnitina, 649
      - - - corpos cetônicos, 657
      - - - eicosanoides, 669
      - - - malonil-CoA, 661
      - - - peroxissomo, 656
      - - - prostaglandina, 668
      - - - proteína carreadora de acila, 661
      - - - proteína quinase dependente de AMP, 670
      - - - sintase, 661
      - - - triacilglicerol, 643
      - - - via da b-oxidação, 650
      - - - vitamina B12, 654
  - nítrico, 1047
  - ribonucleico (RNA), 7, 113
  - salicílico, 1048
  - tricarboxílico, 501

Acil adenilato, 649
Aconitase, 959
ACP, 661
Actina, 1020
- decorada, 1022
- - F, 1020
- - G, 1020
- estrutura da, 1021
Açúcar(es)
- não redutor, 327
- redutor, 327
- de cinco carbonos, 599
Adenilato ciclase, 408
Adenina, 6
- nucleotídio translocase, 556
Adenosina, 113
- trifosfato (ATP), 434
Adição α ou formação de ligações duplas, 449
ADME, 1039
Administração, 1039
Aequorea victoria, 92
Afinidade de ligação, 70
AGE, 328
Agonista, 954
Agrecano, 334
Agrobacterium tumefaciens, 168
Água, 10
AHSP, 213
Alanina, 30
- aminotransferase, 684
Albumina sérica humana
- estrutura da, 1041
Alça(s), 44
- hipervariável, 992
- - P, 286
Alcaptonúria, 701
Álcool desidrogenase, 817
Aldolase, 599
Aldose, 322
Aldosterona, 790
Alimentação pobre em fenilalanina, 702
Alinhamento de sequência, 178
Alopurinol, 760
Alvo(s)
- da clorpromazina, 1047
- emergente de fármaco, 1055
Amargo, 970
Amêndoa, 966
Amido, 330, 601
Amiloidoses, 58
Amilopectina, 330
Amilorida, 973
Amilose, 330
Amino açúcar, 332

Aminoácido(s), 20
- biossíntese de
- - essenciais, 717
- - não essenciais, 717
- - canalização do substrato, 728
- - ciclo da metila ativada, 723
- - complexo de nitrogenase, 713
- - etapa comprometida, 729
- - fixação do nitrogênio, 712
- - glutationa, 733
- - inibição por retroalimentação cumulativa, 731
- - multiplicidade enzimática, 730
- - óxido nítrico, 733
- - piridoxal fosfato, 718
- - porfiria, 736
- - S-adenosilmetionina, 722
- - tetra-hidrofolato, 721
- carregados
- - negativamente, 33
- - positivamente, 32
- catabolismo dos
- - aminotransferase, 684
- - biopterina, 699
- - carbamoil fosfato sintetase, 689
- - cetogênico, 694
- - ciclo da
- - - glicose-alanina, 688
- - - da ureia, 689
- - degron, 680
- - fenilcetonúria, 701
- - glicogênico, 694
- - glutamato desidrogenase, 684
- - N-acetilglutamato, 690
- - piridoxal fosfato, 685
- - piridoxamina fosfato, 686
- - proteassoma, 681
- - ubiquitina, 679
- cetogênico, 694
- essenciais, 717
- glicogênico, 694
- hidrofóbicos, 30
- não essenciais, 717
- polares, 32
Aminoacil-tRNA sintetase, 894
Aminotransferase, 684
AMP cíclico, 303
AMPK, 670
Amplificador, 875, 949
Anabolismo, 432
Anaeróbico obrigatório, 472
Analisador de massa, 94
- por tempo de voo (TOF), 94
Análise por enzimas de restrição, 142
Analito, 93

Análogo(s)
- de estado de transição, 245
- de substratos reativos, 243
- 2'-3'didesoxi, 145
- do estado de transição, 245
- sintético, 271
Androstenediona, 791, 954
Anelamento, 122
Anemia
- de Cooley, 212
- falciforme, 37, 211
- hemolítica induzida, 614
Ângulo
- de torção, 39
- phi, 39
- psi, 39
Anidrase carbônica, 209, 268, 273
Ânion superóxido, 200
Anômero, 325
Anquirina
- estrutura repetida da, 980
Antagonista, 954
Anticoagulante, 312, 314
Anticódon, 130, 895
Anticorpo(s), 86
- catalítico (abzyme), 246
- contra a lisozima, 994
- monoclonal, 88
- policlonal, 88
Antielastase, 309
Antígeno, 87, 987
- carcinoembrionário (CEA), 1009
- leucocitário humano (HLA), 1000
- prostático específico, 263
Antissoro, 88
Antitransportador, 382
Apoenzima, 223
Apoptose, 305, 563
Apoptossoma, 563
Apresentação de peptídios
- de proteínas citoplasmáticas, 1000
- de proteínas internalizadas, 1004
Aquaporina, 396
Aquiral, 30
Araquidonato, 668, 669
Arcabouço, 36
Archaea, 5
Arginina, 32
Armazenamento da informação, 7
Aromatase, 791
Arrestina, 976
Árvore
- da vida, 5
- evolutiva, 189

Ascorbato, 819
Asparagina, 32
Aspartato, 33
- aminotransferase, 684, 687
- transcarbamilase, 291, 292
Aspartil proteases, 266
Aspergillus cereus, 1048
Aspirina, 1048
Atenolol, 1053
Atenuação, 936
Ateroma, 1048
Ativação
- da célula B, 997
- da célula T, 1003
- enzimática pela tiorredoxina, 603
- proteolítica, 292
Ativador do plasminogênio tecidual, 314
Atividade
- enzimática, 69
- específica, 69, 77
- total, 77
Atorvastatina, 1049
ATP, 434
- ADP translocase (adenina nucleotídio translocase, ANT), 556
- sintase
- - complexo CF1-CF0, 582
- - complexo V, f1f0atpase, 548
Atpase, 281
- do tipo P, 376
Audição, 979
Auto-*splicing*, 886
Autoimunidade, 1009
Autoindutor, 936
Autótrofo, 594
Azatioprina, 1056
Azedo, 970

B

β-AR, 406
B-DNA, 117
β-galactosidase, 930
β_2-microglobulina, 1000
Bacillus amyloliquefaciens, 263
Bacteria, 5
Bacteriorrodopsina, 358
BAL, 522
Balsa lipídica, 365
Barreira hematencefálica, 1042
Base de Schiff, 975
- protonada, 975
Bastonete, 974
Benzaldeído, 966
Beribéri, 521
Biblioteca

- de cDNA, 156
- genômica, 154
Bicamada lipídica, 354, 356
2,3-bifosfoglicerato, 206
Biliverdina, 736
Biobalística, 169
Biodisponibilidade oral, 1040
Biofilme, 936
Bioinformática
- alinhamento de sequência, 178
- árvore evolutiva, 189
- evolução convergente, 187
- evolução divergente, 187
- homólogo, 176
- matriz de substituição, 180
- ortólogo, 177
- parálogo, 176
- pesquisa BLAST, 183
- química combinatória, 190
- sequência modelo, 186
- substituição conservadora, 180
Biopterina, 699
Bioquímica
- ácido desoxirribonucleico, 4
- *Archaea*, 5
- aminoácido, 20
- *Bacteria*, 5
- código genético, 21
- dupla hélice, 7
- efeito hidrofóbico, 11
- energia livre, 14
- entalpia, 13
- entropia, 13
- estrutura de ressonância, 9
- eucarionte, 5
- *Eukaria*, 5
- interação de van der Waals, 10
- interação eletrostática, 9
- interação hidrofóbica, 12
- ligação covalente, 7
- macromolécula biológica, 4
- metabólito, 4
- pH, 15
- ponte de hidrogênio, 10
- predisposição, 22
- procarionte, 5
- proteína, 4
- tampão, 17
- valor de pKa, 17
Biotina, 486
Bolha de transcrição, 859
Bomba, 373
- acionada por ATP, 373
- de Na^+–K^+ (Na^+–K^+ ATPase), 376

Bordetella pertussis, 424
Botão gustativo, 970
Braço
- de alavanca, 1019
- - da miosina, 1026
- de dimerização, 418
Bromodomínio, 955, 956
bZip, 948

C

Ca^+ ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), 376
Cadeia
- α, 201
- β, 201
- de transporte de elétrons, 532
- lateral, 29, 36
- - aromáticas, 30
- leve (L), 989
- - de miosina, 1017
- - essencial, 1016
- - regulatória, 1016
- pesada (H), 989, 1016
- polipeptídica, 35, 36
- principal, 36
Caenorhabditis elegans, 68, 160
Caixa
- CAAT, 129
- de Hogness, 129
- de Pribnow, 128
- TATA, 872
Calmodulina, 412, 628
Calnexina, 341
Calor, 14
Calreticulina, 341
Camundongo transgênico, 166
Canal(is), 373
- acetilcolina, 391
- antitransportador, 382
- aquaporina, 396
- ATPase do tipo P, 376
- bomba, 373
- - acionada por ATP, 373
- - de Na^+–K^+, 376
- Ca^+ ATPase do retículo sarcoplasmático, 376
- carreador, 373
- conexina, 396
- conéxon, 396
- de Na^+ sensível à amilorida, 973
- difusão
- - facilitada, 373
- - simples, 374
- digitalina, 379
- domínio de cassete de ligação de ATP, 380
- equação de Nernst, 393

- esteroide cardiotônico, 379
- eversão, 378
- fenda sináptica, 391
- filtro de seletividade, 387
- gigavedação, 385
- H^+–K^+ ATPase gástrica, 376
- impulso nervoso, 384
- intercelulares, 395
- iônico, 384
  - - regulado por cgmp, 976
- junção comunicante, 395
- lactose permease, 383
- modelo de bola e cadeia, 390
- neutrotransmissor, 391
- potencial de
  - - ação, 384
  - - equilíbrio, 393
  - - eletroquímico, 375
- proteína de resistência a múltiplos fármacos, 380
- receptor de acetilcolina, 391
- regulado
  - - por ligante, 392
  - - por voltagem, 389
- regulado
  - - por ligante, 392
  - - por voltagem, 389
- resistência a múltiplos fármacos, 380
  - - secundário, 382
- síndrome do QT longo, 394
- técnica de fixação de placas, 385
- transportador
  - - ABC, 380
- transporte ativo, 373
  - - primário, 373
  - - secundário, 373
- uniportador, 382

Canalização do substrato, 728
Câncer de mama e de ovário, 791
CAP, 933
Captura óptica, 1023
Carbamato, 210, 596
Carbamoil fosfato sintetase, 689, 743
Carbânion, 610
Carboidratos
- açúcar não redutor, 327
- açúcar redutor, 327
- aldose, 322
- amido, 330
- anômero, 325
- celulose, 330
- cetose, 322
- complexo de Golgi, 335
- diastereoisômero, 323
- dissacarídio, 329

- dolicol fosfato, 336
- enantiômero, 323
- epímero, 324
- estereoisômero, 323
- furanose, 325
- glicobiologia, 322
- glicoforma, 332
- glicogênio, 330
- glicômica, 322
- glicoproteína, 331
- glicosaminoglicano, 332
- glicosiltransferase, 337
- hemiacetal, 324
- hemicetal, 324
- heptose, 322
- hexose, 322
- isômero constitucional, 323
- lectina, 340
- ligação glicosídica, 328
- monossacarídio, 322
- mucina, 332
- oligossacarídio, 329
- pentose, 322
- piranose, 324
- polissacarídio, 330
- produtos finais de glicosilação avançada, 328
- proteína de ligação de glicanos, 339
- proteoglicano, 332
- retículo endoplasmático, 335
- selectina, 341
- tetrose, 322
- triose, 322

Carbono α, 29
Carboxamida, 32
Carboxi-hemoglobina, 207
Carga, 70
- energética, 450

Carnitina, 649
Carotenoide, 586
Carreador, 373
- ativado, 442

Cascata
- de ativações de zimogênios, 310
- de fosfoinositídio, 410
- de transdução do sinal olfatório, 968
- enzimática, 309

Caspase, 563
Catabolismo, 432
Catalase, 546
Catálise
- ácido-base geral, 256
- alça-P, 286
- ATPase, 281
- cavidade de oxiânion, 260

- covalente, 256, 257
- deslocamento em linha, 275
- encaixe induzido, 256
- energia de ligação, 256
- inibidor da protease, 266
- lançadeira de prótons, 272
- metilases, 279
- por aproximação, 256
- por íons metálicos, 256
- reação de modificação química, 258
- sequência de reconhecimento, 274
- sistema de restrição-modificação, 279
- transferência gênica horizontal, 280
- tríade catalítica, 260
Cauda poli(A), 877
Cavidade de oxiânion, 260
CCK, 801
CD4, 1005
CD8, 1002
cDNA, 156
CDP-diacilglicerol, 767
CDR, 992
CEA, 1009
Celebrex®, 1052
Celecoxibe, 1052
Célula(s)
- B, 987,
- - ativação da, 997
- - receptor de, 997
- de um único tipo, 88
- eucarióticas, 366
- hepática, 620
- pilosa, 979
- T, 999
- - ação da, auxiliar, 1006
- - ativação da, 1003
- - auxiliar, 1004
- - complexo de receptor de, 1002, 1003
- - *killer*, 988
- - receptor de 1002
- - seleção de, 1008
- tronco pluripotente induzida, 950
Celulose, 330
Centrifugação
- diferencial, 70
- em banda, 79
- em gradiente, 79
- zonal, 79
Centro
- de manganês, 578
- de peptidil transferase, 909
- de reação, 573
- de Rieske, 540
Ceramida, 770

Cerebrosídio, 352, 770
Cervo muntjac da Índia, 115
Cetoacidúria de cadeia ramificada, 701
Cetose, 322
- diabética, 659
Cetuximabe, 423
cGMP fosfodiesterase, 976
Chaperonas, 52
CheY, 1032
Chip, 951
- de DNA, 164
Chiquimato, 725
Ciclo
- celular, 842
- da glicose-alanina, 688
- da metila ativada, 723
- da ureia, 689
- de Calvin, 593
- - aldolase, 599
- - amido, 601
- - autótrofo, 594
- - fotorrespiração, 598
- - glicose 6-fosfato desidrogenase, 605
- - glutationa, 613
- - heterótrofo, 594
- - metabolismo ácido das crassuláceas, 605
- - peroxissomo, 597
- - planta C_3, 604
- - planta C_4, 604
- - reservatório de hexose monofosfato, 598
- - rubisco, 595
- - sacarose, 601
- - tiorredoxina, 603
- - transcetolase, 598
- - via C_4, 604
- - via de pentose fosfato, 605
- de Cori, 494
- de fome-saciedade, 813
- de Krebs, 501
- de substratos, 493
- do ácido cítrico, 501
- - α-cetoglutarato desidrogenase, 511
- - acetil-CoA, 501
- - beribéri, 521
- - do glioxilato, 522
- - citrato sintase, 508
- - complexo piruvato desidrogenase, 503
- - flavoproteína, 506
- - fosforilação oxidativa, 502
- - glioxissoma, 523
- - isocitrato desidrogenase, 510
- - isocitrato liase, 523
- - malato sintase, 523
- - metabolon, 516

- - proteína ferro-enxofre, 510
- - reação anaplerótica, 520
- do glioxilato, 522
- êntero-hepático, 1044
- glicose-alanina, 689
- lisogênico, 152
- lítico, 152
- Q, 540
Ciclosporina, 998
Ciência da informação, 19
Cinesina, 1016
- convencional, 1018
- domínio da cabeça da, 1018
- estrutura da, 1018
- monitoramento dos movimentos mediados pela, 1028
Cinética
- de Michaelis-Menten, 233
- enzimática, 231
Circuito
- do glicerol 3-fosfato, 555
- do malatoaspartato, 555
Circulação, 1044
Circular, 118
Cisteína, 32
- proteases, 265
Cit c, 539
Citidina, 113
- difosfodiacilglicerol, 767
Citocromo
- bf, 579
- c (Cit c), 539
- c oxidase (complexo IV), 541
Citoesqueleto, 1015
Citoglobina, 214
Citosina, 6
Citrato sintase, 508
Classes de imunoglobulina, 991
Clatrina, 367
Clivagem da imunoglobulina G, 990
Clonagem de expressão, 156
Clone, 89
Clorofila α, 572
Cloroplasto, 571
Clorpromazina, 1046
- alvos da, 1047
Coagulação do sangue, 305
Coativador, 953
Cobalamina, 654
Código genético, 21, 130
Códon, 21, 112, 130, 895
Coeficiente(s)
- de Hill, 216
- de sedimentação, 78
Coenzima, 223

- Q, 532
- - citocromo c oxidorredutase (complexo III), 539
Cofator, 223
Colagenase, 305
Colágeno, 46, 305, 334
Colecistocinina (CCK), 801
Cólera, 423
Colerágeno, 424
Colesterol, 352, 773
Colônia, 155
Cominho, 966
Compactina, 1048
Compartimento, 1041
Complexo
- CF_1-CF_0, 582
- coletor de luz, 586
- de Golgi, 335
- de nitrogenase, 713
- de origem de replicação (ORC), 841
- de remodelagem de cromatina, 956
- de silenciamento induzido por RNA, 168
- de troponina, 1024
- do receptor de célula T, 1003
- - MHC da classe I, 1002
- I, 537
- II, 539
- III, 539
- IV, 541
- microRNA-Argonauta, 959
- piruvato desidrogenase, 503
- principal de histocompatibilidade (MHC), 1000
- tamoxifeno-receptor de estrógeno, 955
- V, f_1f_0ATPase, 548
Composição
- das bases, 128
- de aminoácidos, 82
Compostos xenobióticos, 1042
Comprimento do braço de alavanca da miosina, 1026
Comunicação cruzada, 404
Concentração(ões)
- crítica, 1022
- efetivas, 1039
Cone, 974
Conexina, 396
Conexões sensoriais com o cérebro, 966
Conéxon (hemicanal), 396
Conformação aleatória, 51
Conjugação, 1042
Conjugado de ciclofosfamida-glutationa, 1042
Constante
- de dissociação (Kd), 1038
- de equilíbrio, 16
- de inibição (Ki), 1039
- de Michaelis, 233

- de velocidade, 231
Contorção, 832
Contração muscular, 493
Controle
- adaptativo, 671
- alostérico, 291
- combinatorial, 949
- de aceptor, 559
- do término da replicação, 145
- respiratório, 559
Conversão do ibuprofeno pelo P450, 1041
Cooperatividade, 291
Coproporfirinogênio III, 735
Coqueluche, 423
Corismato, 725, 726
Corpos cetônicos, 657, 658
Corpúsculos de Heinz, 614
Correceptor
- CD4, 1005
- CD8, 1003
Correlação fenótipo-genótipo, 1055
Correpressor, 933
Cotransportador, 382
CPS, 743
Cristalografia de raios X, 100, 229
Cromatina, 945
- de ordem superior, 947
- imunoprecipitação da, 951
- remodelagem da, 956
Cromatografia
- de afinidade, 72
- de filtração em gel, 71
- de troca iônica, 71, 72
- líquida de alta pressão, 73
Cromóforo, 975
Cromossomo
- artificial bacteriano, 153
- artificial de levedura, 153
- de levedura, 944
CTD, 871
Curva de ligação ao oxigênio, 201
Cyranose 320, 970

D

Dálton, 36
Daltonismo, 978
Dedo de zinco Cys_2His_2, 948
Defeito do tubo neural, 761
Defeitos do tubo neural, 761
Deficiência
- de ácido fólico, 761
- de argininossuccinase, 693
- de vitamina D, 792
- mental, 760

Degradação
- de Edman, 83
- do glicogênio, 621
- do heme, 736
Degron, 680
Deleções, 158
Depressão revestida por clatrina, 367
Desaminase da adenosina, 169
Desintoxicação de substâncias estranhas, 788
Deslocamento
- em linha, 275
- químico, 103
Desnaturação, 122
- do DNA pela adição de base, 16
Desoxi-hemoglobina, 204
Desoxiadenilato, 114
Desoxiadenosina, 113
Desoxicitidilato, 114
Desoxicitidina, 113
Desoxiguanilato, 114
Desoxiguanosina, 113
Desoximioglobina, 198
Desoxirribose, 6, 112
Determinante antigênico, 87, 988
Di-hidrofolato redutase, 755
Di-hidrotestosterona, 791
Diabetes
- tipo 1, 805
- tipo 2, 805
Diagrama de Ramachandran, 39
Diálise, 71
Dianabol, 954
Diastereoisômero, 323
Diciclo-hexilcarbodiimida (DCC), 99
Dicumarol, 312
Difusão
- facilitada, 373, 375
- lateral, 361, 363
- simples, 374
Digitálicos, 379
Digitalina, 379
Digitoxigenina, 379
Di-hidroacetona, 609
Dímero αβ, 201
Dineína, 1016
- estrutura da, 1019
Dióxido de carbono, 209
Dioxigenase, 819
Disposição dos microtúbulos, 1027
Dissacarídio, 329
Dissecção da miosina, 1017
Distância, 9
Distorção do DNA, 278
Distribuição, 1041

- do fármaco fluconazol, 1041
Diversidade
- biológica, 3
- de sequência das imunoglobulinas, 991
DNA, 4, 112
- ciclo celular, 842
- complementar, 156
- complexo de origem de replicação, 841
- contorção, 832
- exonuclease, 827
- fita
- - condutora, 830
- - defasada, 830
- forquilha de replicação, 829
- fragmento de Okazaki, 829
- gene supressor de tumores, 848
- grampo de deslizamento, 838
- helicase, 830
- iniciador, 827
- junção
- - de extremidades não homólogas, 847
- - de Holliday, 851
- ligase, 150, 830
- modelo em trombone, 839
- molde, 826
- mutagênico, 843
- número de ligação, 832
- origem de replicação, 840
- polimerase, 123, 826
- primase, 829
- processividade, 837
- proviral, 165
- RecA, 851
- recombinase, 851
- reparo
- - de pareamento impróprio, 846
- - direto, 846
- - por excisão de bases, 846
- - por excisão de nucleotídios, 846
- repetição de trinucleotídios, 848
- sinapse de recombinação, 852
- superespiralamento, 832
- telomerase, 843
- telômero, 842
- teste de Ames, 849
- topoisomerase, 834
- topoisômero, 832
- torção, 832
Doce, 970
Doença(s)
- autoimune, 1009
- carenciais, 22
- da célula I, 338
- da debilidade crônica, 58

- da urina do xarope de bordo, 701
- da vaca louca, 58
- de Charcot-Marie-Tooth, 1026
- de Creutzfeldt-Jakob, 58
- de Hurler, 334
- de McArdle, 639
- de Pompe, 639
- de von Gierke, 638
- dos ossos de vidro, 47
- pulmonar destrutiva, 309
- vascular, 725
Dolicol fosfato, 336
Domínio(s), 5, 49
- aminoterminal, 622
- carboxiterminal, 622, 871
- da cabeça da cinesina, 1018
- de cassete de ligação de ATP (ABC), 380
- de homologia
- - à plecstrina, 415
- - Src 2 (SH2), 416
- - Src 3 (SH3), 419
- de imunoglobulina, 992
- de ligação com acetil-lisina, 955
- do tipo zinc-finger, 948
- gla, 312
- kringle, 312
- regulatório recorrente, 730
- variáveis, 993
Dopamina, 1046
Dose letal, 1044
Drosophila melanogaster, 68
Ducto biliar, 1044
Dupla hélice, 7, 111

E

Edição do RNA, 878
EF-G, 910
Efeito(s)
- Bohr, 208
- Circe, 237
- colaterais, 1039
- heterotrópico, 298
- hidrofóbico, 11, 30
- hipocrômico, 122
- homotrópico, 296
- nuclear Overhauser, 104
- placebo, 1057
- Warburg, 482
Efeitos estereoeletrônicos, 687
Efetor alostérico, 207, 208
Eficiência catalítica, 236
EGF, 417
EGFR, 417
Eicosanoides, 669

Elastase, 309
Elemento(s)
- de resposta ao estrógeno (ERE), 952
- de resposta ao ferro (IRE), 958
- genético móvel, 161
- intercalados curtos (SINES), 161
- intercalados longos (LINES), 161
Eletroforese
- bidimensional, 76
- capilar, 145
- em gel, 73
- - de poliacrilamida, 357
Eletroporação, 169
Elevação (translação), 41
ELISA, 90
Empilhamento das bases, 12
Enantiômero, 323
Encaixe induzido, 230, 256
Encefalopatia espongiforme bovina, 58
Endocitose mediada por receptor, 367, 781
Endonucleases de restrição, 143, 273
Endossimbiose, 367
Endossomo, 368
Endotoxina, 987
Energia, 9
- cinética, 13
- de ligação, 231, 256
- livre, 14, 224
- - de ativação, 224
- - - de Gibbs, 14, 227
- potencial, 13
Enfisema, 309
Enhancer, 949
Enolfosfato, 469
Enovelamento
- de imunoglobulina, 992
- de proteínas, 20
- do tipo ATP grasp, 743
- do tipo globina, 201
Ensaio, 69
- enzimático imunoabsorvente (ELISA), 90
Entalpia, 13
Enteropeptidase, 307
Entropia, 13
Enzima(s), 222, 458
- alostérica, 239
- análogo do estado de transição, 245
- anticorpo catalítico, 246
- apoenzima, 223
- bifuncional, 491
- coenzima, 223
- cofator, 223
- de restrição, 143
- digestivas, 305

- encaixe induzido, 230
- energia livre, 224
- - de ativação, 224
- equação de Michaelis-Menten, 234
- estado de transição, 227
- gráfico de Lineweaver-Burk, 235
- grupo prostético, 223
- holoenzima, 223
- homólogas, 692
- inibição
- - baseada no mecanismo, 244
- - competitiva, 240
- - incompetitiva, 240
- - não competitiva, 240
- K_M, 233
- marcador de afinidade, 243
- número de renovação, 236
- proteolíticas, 222
- razão k_{cat}/K_M, 237
- reação
- - de duplo deslocamento, 239
- - sequencial, 238
- reagente específico de grupo, 243
- sítio ativo, 229
- substrato, 222, 228
- Vmáx., 234
Epímero, 324
Epinefrina, 628
Epitélio
- nasal principal, 967
- olfatório principal, 966
Epitopo, 87, 988
Equação
- de Cheng-Prusoff, 1039
- de Henderson-Hasselbalch, 18
- de Michaelis-Menten, 231, 234
- de Nernst, 393
Equilíbrio de sedimentação por gradiente de densidade, 121
ERE, 952
Eritrócitos com corpúsculos de Heinz, 614
Eritropoetina, 332
Eritrose 4-fosfato, 607
ERK, 420
Escherichia coli, 5
Esclerose lateral amiotrófica, 142, 149
Esclerótica azul, 47
Escoadouro de elétrons, 609
Escorbuto, 446
Esfingolipídio, 769
Esfingomielina, 351
Esfingosina, 350
ESI, 93
Espasticidade, 760
Espectro(s)

- de absorção da rodopsina, 975
- de absorção de pigmentos dos cones, 977
- eletromagnético, 974
Espectrometria de massa, 93
- sequencial (tandem), 95
- tandem, 95
Espectroscopia por ressonância magnética, 103
Espinha bífida, 761
Esquema Z de fotossíntese, 581
Estabilização
- graças à hidratação, 437
- por ressonância, 437
Estado
- de transição, 227
- R, 204
- T, 204
Estatinas sintéticas, 1049
Esterecílio, 979
- Estereoisômeros, 29, 323
Estereoquímica, 23
Esteroide
- anabólico, 954
- cardiotônico, 379
Estômato, 604
Estradiol, 791, 952
Estresse do retículo endoplasmático (RE), 808
Estroma, 571
Estrona, 791
Estrutura(s)
- covalente do DNA, 6
- da actina, 1021
- da albumina sérica humana, 1041
- da angiogenina, 176
- da cinesina, 1018
- da cromatina, 944
- da dineína, 1019
- da ferritina, 957
- da flagelina, 1030
- da histona acetiltransferase, 955
- da imunoglobulina G, 990
- da mioglobina, 198
- da miosina, 1016, 1017
  - - ligada à actina, 1022
- de cromatina de ordem superior, 947
- de homeodomínio, 948
- de ressonância, 9
- de um bromodomínio, 956
- do gelo, 11
- do microtúbulo, 1026
- primária, 37
- quaternária, 50
- repetida da anquirina, 980
- secundária, 40
- supersecundárias, 49

- terciária, 47
Estudos de conjuntos, 248
Etapa
- comprometida, 729
- limitante, 478
Etileno, 724
Eucarionte, 5
Eucariotos
- agonista, 954
- amplificador, 949
- antagonista, 954
- bromodomínio, 955
- célula-tronco pluripotente induzida, 950
- coativador, 953
- complexo de remodelagem de cromatina, 956
- controle combinatorial, 949
- cromatina, 945
- domínio
- - de ligação com acetil-lisina, 955
- - do tipo zinc-finger, 948
- elemento
- - de resposta ao estrógeno, 952
- - de resposta ao ferro, 958
- esteroide anabólico, 954
- fator
- - associado à proteína de ligação TATA, 956
- - de transcrição, 947
- ferritina, 957
- hipometilação, 951
- histona, 944
- - acetiltransferase, 955
- - desacetilase, 956
- homeodomínio, 947
- ilhota de CpG, 952
- imunoprecipitação de cromatina, 951
- mediador, 948
- microRNA, 959
- modulador seletivo de receptor de estrógeno, 954
- nucleossoma, 945
- partícula central do nucleossoma, 945
- proteína(s)
- - com zíper de leucina básica, 948
- - da família Argonauta, 959
- - ligante de IRE, 958
- receptor
- - de transferrina, 957
- - nuclear de hormônio, 952
- sítio hipersensível, 950
- tipo de célula, 944
- transferrina, 957
Eukaria, 5
Eversão, 378
Evolução
- convergente, 187

- divergente, 187
Excreção, 1042
Éxons, 112, 134
Exonuclease, 827
Expressão
- da cadeia leve, 996
- da gustducina na língua, 971
Extremidades
- adesivas, 150
- coesivas, 150
- complementares de fita única, 150

F

F_{ab}, 989
Fago lambda (λ), 152
Fagócito, 986
Farmacologia, 1038
Fármacos, 1038
- ADME, 1039
- anti-HIV, 1052
- ateroma, 1048
- barreira hematencefálica, 1042
- biodisponibilidade oral, 1040
- ciclo êntero-hepático, 1044
- compartimento, 1041
- compostos xenobióticos, 1042
- conjugação, 1042
- constante
  - - de dissociação, 1038
  - - de inibição, 1039
- efeito colateral, 1039
- equação de Cheng-Prusoff, 1039
- glomérulo, 1043
- índice terapêutico, 1044
- ligante, 1038
- metabolismo
  - - de fármacos, 1042
  - - de primeira passagem, 1043
- miopatia, 1048
- oxidação, 1042
- planejamento de fármacos com base na estrutura, 1051
- química combinatória, 1049
- regras de Lipinski, 1040
- síntese split-pool, 1049
- transformação
  - - de fase I, 1043
  - - de fase II, 1043
- triagem de alto rendimento, 1049
Fase(s)
- de leitura, 132
- dos ensaios clínicos, 1057
- oxidativa da via das pentoses fosfato, 607
Fator(es)
- associado à proteína de ligação TATA (TAF), 956

- de alongamento G (EF-G) (translocase), 910
- de alongamento
- - Ts, 909
- - Tu, 908
- de crescimento epidérmico (EGF), 417
- de iniciação, 908
- de liberação, 132, 912
- de transcrição, 873, 947
- de troca de nucleotídios de guanina (GEF), 419
- epigenéticos, 22
- tecidual, 310
- $XIII_a$, 311
Fc, 989
Feixe piloso, 979
Fenda sináptica, 391
Fenil isotiocianato, 83
Fenilalanina, 30, 700, 702
Fenilcetonúria, 701, 702
Fermentação, 470
- alcoólica, 457
- láctica, 457
Ferritina, 957
- estrutura da, 957
Ferro
- não heme, 510
- não hêmico, 538
Fibras amiloides, 58
Fibrina, 311
Fibrinogênio, 310
Fibrinopeptídios, 310
Fibrose cística, 38
Fígado, 1044
Filamento(s)
- deslizantes, 1025
- espesso, 1025
Filtro de seletividade, 387
Fita
- β, 43
- condutora, 830
- defasada, 830
Fixação do nitrogênio, 712
Flagelina, 1030
- estrutura da, 1030
Flagelos bacterianos, 1030
Flavina mononucleotídio (FMN), 537
Flavoproteína, 506
Flexibilidade
- e função, 28
- segmentar, 990
Flig, 1031
Fluconazol
- distribuição do fármaco, 1041
FMN, 537
Focalização isoelétrica, 75

Folha β pregueada, 42
Força(s)
- próton-motriz, 529, 582
- de empilhamento, 117
Formação
- da dupla hélice, 8
- - e entropia, 15
- do 3-fosfoglicerato, 596
Formas amiloides, 58
Forquilha de replicação, 829
Fosfatidato, 766
Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2, 410
Fosfito triéster, 146
3′-fosfoadenosina-5′-fosfossulfato, 1043
Fosfofrutoquinase (PFK), 462, 477, 479
3-fosfoglicerato, 595
- desidrogenase, 729
Fosfoglicerato mutase, 468
Fosfoglicerídio, 350
Fosfoglicomutase, 625
6-fosfogliconato, 605
- desidrogenase, 605
6-fosfoglicono-d-lactona, 605
Fosfolipase C, 410
Fosfolipídio, 350, 354, 767
Fosfopanteteína, 662
Fosfopentose
- epimerase, 600, 607
- isomerase, 600
Fosforilação, 302
- ao nível do substrato, 468
- oxidativa, 441, 502, 529
- - apoptose, 563
- - apoptossoma, 563
- - ATP-
- - - ADP translocase, 556
- - - sintase, 548
- - cadeia de transporte de elétrons, 532
- - caspase, 563
- - catalase, 546
- - centro de Rieske, 540
- - ciclo Q, 540
- - circuito
- - - do glicerol 3-fosfato, 555
- - - do malatoaspartato, 555
- - citocromo c, 539
- - - oxidase, 541
- - coenzima Q, 532
- - - citocromo c oxidorredutase, 539
- - controle respiratório, 559
- - flavina mononucleotídio, 537
- - força próton-motriz, 529
- - fosforilação oxidativa, 529
- - NADH-coenzima Q oxidorredutase, 537

- - permeabilização da membrana mitocondrial externa, 563
- - pool de Q, 537
- - potencial de redução, 532
- - proteína
- - - desacopladora, 560
- - - ferro-enxofre, 538
- - respiração celular, 530
- - succinato-coenzima Q redutase, 539
- - superóxido dismutase, 545
Fosforilase
- hepática, 627
- muscular, 625
- quinase, 627
Fosforólise, 621
5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), 744
Fosforribulose quinase, 600
Fosfosserina, 60
Fosfotirosina, 60
Fosfotreonina, 60
Fosfotriéster, 146
Fotodegradação, 363
Fotofosforilação cíclica, 584
Fotorreceptores de verde e de vermelho, 977
Fotorrespiração, 597, 598
Fotossíntese
- ATP sintase, 582
- carotenoide, 586
- centro de manganês, 578
- centro de reação, 573
- citocromo bf, 579
- clorofila a, 572
- cloroplasto, 571
- complexo coletor de luz, 586
- esquema Z de fotossíntese, 581
- estroma, 571
- força próton-motriz, 582
- fotofosforilação cíclica, 584
- fotossistema
- - I, 576
- - II, 576
- granum, 571
- membrana tilacoide, 571
- P680, 577
- P700, 580
- P960, 575
- par especial, 574
- reações de fase clara, 570
- separação fotoinduzida de carga elétrica, 573
Fotossistema
- I (PS I), 576
- II (PS II), 576
Fototrófico, 432
Fração de saturação, 201
Fragmento(s)

- de cadeia terminados, 145
- de Okazaki, 829
- S1, 1017
6-fosfato, 607
Funil de enovelamento, 56
Furano, 325
Furanose, 325

G

$G_{(olf)}$, 967
Gambá, 966
Gangliosídio, 352, 770
Gap junctions, 395
GAP, 420
GEF, 419
Gene(s), 21
- biblioteca
- - de cDNA, 156
- - genômica, 154
- camundongo transgênico, 166
- complexo de silenciamento induzido por RNA, 168
- controle do término da replicação, 145
- cromossomo artificial
- - bacteriano, 153
- - de levedura, 153
- DNA
- - complementar, 156
- - ligase, 150
- elemento(s)
- - genético móvel, 161
- - intercalados curtos, 161
- - intercalados longos, 161
- enzima de restrição, 143
- extremidades coesivas, 150
- fago lambda, 152
- gun, 169
- interrupção gênica, 166
- knockout, 166
- microarranjo de DNA, 164
- mutagênese
- - de cassete, 158
- - sítio-dirigida, 158
- Northern blotting, 144
- palíndromo, 143
- PCR quantitativa, 163
- plasmídio, 150
- - indutor de tumor, 168
- polimorfismo, 149
- projetados, 159
- pseudogene, 161
- reação em cadeia da polimerase, 147
- RNA de interferência, 167
- sonda de DNA, 144
- Southern blotting, 144

- supressor de tumores, 422, 848
- transcriptase reversa, 156
- transcriptoma, 164
- vetor, 150
- - de expressão, 152
Gengibre, 966
Genomas, 68
Genômica comparada, 20
Geraniol, 966
GFP, 92
Gigavedação, 385
Gliceraldeído 3-fosfato, 607
Glicerol, 350
Glicina, 30
Glicobiologia, 322
Glicoforma, 332
Glicogenina, 632
Glicogênio, 330
- degradação do, 621
- estrutura, 620
- fosforilase, 621
- grânulos de, 620
- metabolismo do
- - calmodulina, 628
- - epinefrina, 628
- - fosforilase, 621
- - - quinase, 627
- - fosforólise, 621
- - glicogenina, 632
- - glucagon, 628
- - insulina, 636
- - piridoxal fosfato, 623
- - proteína
- - - fosfatase 1, 635
- - - quinase A, 630
- - sintase, 632
- - uridina difosfato glicose, 631
- remodelamento do, 624
- sintase, 632
Glicolipídio, 350, 354
Glicólise, 457
- aeróbica, 482
- α-amilase, 458
- anaeróbico obrigatório, 472
- biotina, 486
- ciclo
- - de Cori, 494
- - de substratos, 493
- enolfosfato, 469
- enzima bifuncional, 491
- etapa limitante, 478
- fermentação, 470
- - alcoólica, 457
- - láctica, 457

- fosfofrutoquinase, 462
- fosfoglicerato mutase, 468
- fosforilação ao nível do substrato, 468
- glicólise, 457
- - aeróbica, 482
- gliconeogênese, 457
- glicose 6-fosfatase, 488
- hexoquinase, 459
- intermediário tioéster, 466
- piruvato
- - carboxilase, 486
- - quinase, 469
- quinase, 461
- retroalimentação positiva, 480
- *Rossmann fold*, 473
Glicômica, 322
Gliconeogênese, 457
Glicopeptídio transpeptidase, 247
Glicoproteína, 331
- P, 380
Glicosaminoglicano, 332
Glicose, 970
- 6-fosfatase, 488
- 6-fosfato desidrogenase, 605, 614
Glicosiltransferase, 337
Glicuronidato de morfina, 1042
Glioxissoma, 523
Globinas, 177
Glomérulo, 1043
GLP-1, 801
Glucagon, 628
Glutamato, 33, 53, 696, 970
- desidrogenase, 684
Glutamina, 32, 613, 733
- fosforribosil amidotransferase, 747
Glutationa, 733, 1043
- peroxidase, 614, 733
Gordura neutra, 643
Gota, 759
GPCR, 406
Gráfico
- de dupla-recíproca, 235
- de hidropatia, 362
- de Lineweaver-Burk, 235
Grampo, 119
- de bases pareadas, 129
- de deslizamento, 838
Grânulos de glicogênio, 620
Granum, 571
Granzima, 1004
Grupo(s)
- acetil, 59
- hidroxila, 59
- prostéticos, 223

- R, 29
Guanilato ciclase, 977
Guanina, 6
Guanosina, 113
Gustducina, 971

H

H^+–K^+ ATPase gástrica, 376
Haemophilus influenzae, 160
Hapteno, 998
HAT, 955
HDL, 779
Helicases, 122, 830
Hélice
- de B-DNA, 117
- relé, 1019, 1020
- - volta-hélice, 49
α-hélice, 40
Hemaglutinina, 341
Heme, 198
Hemiacetal, 324
- intramolecular, 324
Hemicetal, 324
Hemofilia
- A, 313
- clássica, 313
Hemoglobina, 198
- A, 201
- anemia falciforme, 211
- anidrase carbônica, 209
- ânion superóxido, 200
- 2,3-bifosfoglicerato, 206
- cadeia
- - α, 201
- - β, 201
- carbamato, 210
- carboxi-hemoglobina, 207
- citoglobina, 214
- coeficiente de Hill, 216
- curva de ligação do oxigênio, 201
- dímero αβ, 201
- efeito Bohr, 208
- enovelamento do tipo globina, 201
- estado
- - R, 204
- - T, 204
- fetal, 207
- fração de saturação, 201
- heme, 198
- H, 212
- histidina
- - distal, 200
- - proximal, 199
- ligação cooperativa, 202

- malária, 212
- metamioglobina, 200
- modelo
- - concertado ou coordenado, 204
- - sequencial, 205
- monóxido de carbono, 207
- neuroglobina, 214
- pressão parcial, 201
- proteína estabilizadora da cadeia a de hemoglobina, 213
- protoporfirina, 198
- ressonância magnética funcional, 199
- S, 211
- sigmoide, 202
- talassemia, 212
- - major, 212
- traçado de Hill, 216
Heparina, 314
Heptose, 322
Hereditariedade, 7
Heterótrofo, 594
Hexoquinase, 459, 478, 480
Hexose, 322
- fosfato, 598
Hibridização dos iniciadores, 147
3-hidroxi-3-metilglutaril-coa redutase (HMG-coa redutase), 774
Hipometilação, 951
Hipótese da oscilação, 898
Hipoxia, 483
Histidina, 33, 696
- adicional, 200
- distal, 200
- proximal, 199
Histona(s), 944
- acetiltransferase, 955
- desacetilase, 956
- homólogas, 946
HIV, 1007
- receptor do, 1007
HLA, 1000
HMG-coa redutase, 774
Holoenzima, 223
Homeodomínio, 947, 948
Homeostasia
- calórica, 797
- da glicose, 813
- energética, 797
Homocisteína, 725
Homogenato, 69
Homologia, 176
Homólogo, 176
Homopolímero, 330
Hormônio
- antidiurético, 98
- esteroides, 786

Hortelã, 966
HPLC, 73

I

Ibuprofeno, 1042
- pelo P450, conversão, 1041
IDCG, 759
Identidade de sequência, 178
IgA, 991
IgD, 991
IgE, 991
IgG, 989
IgM, 990
Ilhota de CpG, 952
Imprinting genético, 22
Impulso nervoso, 384
Imunização, 1010
Imunodeficiência combinada grave, 759
Imunoglobulina, 86
- A, 991
- classes de, 991
- D, 991
- de um único tipo, 89
- diversidade de sequência das, 991
- E, 991
- enovelamento de, 992
- G, 989
  - - clivagem da, 990
  - - estrutura da, 990
- M, 990
- produção de, 987
Imunoprecipitação da cromatina, 951
Imunotoxinas, 159
Inanição, 814
Índice terapêutico, 1044
Indinavir, 267
Individualidade, 21
Indutor, 932
Informação genética
- ácido
  - - desoxirribonucleico, 112
  - - ribonucleico, 113
- A-DNA, 117
- anticódon, 130
- B-DNA, 117
- código genético, 130
- códon, 130
- desoxirribose, 112
- DNA polimerase, 123
- dupla hélice, 111
- éxon, 134
- iniciador, 123
- íntron, 134
- microRNA, 126

- molde, 123
- nucleosídio, 113
- nucleotídio, 113
- pirimidina, 113
- purina, 113
- região promotora, 128
- reorganização de éxons, 135
- replicação semiconservativa, 120
- ribose, 112
- ribossomo, 132
- RNA
- - mensageiro, 125
- - nuclear pequeno, 126
- - pequeno, de interferência, 126
- - polimerase, 126
- - ribossômico, 126
- - transportador, 126
- sequência Shine-Dalgarno, 132
- spliceossomo, 134
- *splicing*, 134
- - alternativo, 135
- tradução, 125
- transcriptase reversa, 124
- transcrição, 126
- Z-DNA, 118

Inibição
- por retroalimentação, 291
- baseada no mecanismo (suicida), 244
- competitiva, 240
- incompetitiva, 240
- não competitiva, 240
- por retroalimentação, 293
- - pelo produto final, 293
- - cumulativa, 731
- reversível, 240

Inibidor(es)
- alostérico, 293
- baseados no mecanismo, 244
- da protease, 266
- - do HIV, 1051
- da via do fator tecidual, 314
- específicos da COX2, 1052
- irreversível, 240
- pancreático da tripsina, 308
- suicidas, 244

Iniciador, 123, 827
Inserções, 158
Instabilidade dinâmica, 1027
Insulina, 305, 413, 636, 802
Interação(ões)
- de van der Waals, 10
- eletrostática, 9
- - no DNA, 12
- hidrofóbica, 12

- proteína-anticorpo, 994
Interligações, 37
Intermediário(s)
- acil-enzima, 259
- de carbânion, 610
- tetraédrico, 260
- tioéster, 466
Interrupção gênica, 166
Intestino, 1044
Íntrons, 112, 134
Ionização
- da histidina, 33
- por electrospray (ESI), 93
- dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), 93
Íons
- dipolares, 29
- em fase gasosa, 93
- hidrônio, 15
- - precursores, 95
- - produtos, 95
- hidrogênio, 970
- sódio, 970
iPS, 950
IPTG, 932
IRE, 958
IRP, 958
IRS, 415
Isocitrato
- desidrogenase, 510
- liase, 523
Isoenzima, 298
Isoleucina, 30
Isômero constitucional, 323
- 3-isopentenil pirofosfato, 774
Isopropiltiogalactosídeo (IPTG), 932
Isozima, 298
ITAM, 997

J

Jejum prolongado, 814
Junção
- comunicante, 374, 395
- de extremidades não homólogas (NHEJ), 847
- de Holliday, 851

K

K_M (constante de Michaelis), 233

L

Laços ômega, 44
Lactonase, 605
Lactose, 329
- permease, 383

Lançadeira
- de prótons, 272
- do glicerol 3-fosfato, 555
- do malatoaspartato, 555
Lansoprazol, 1054
LDL, 779
Lectina, 340
Leis da termodinâmica, 13
Leptina, 802
Leucemia mielógena crônica, 423
Leucina, 30
Leucinose, 701
Liase(s), 449, 666
Ligação
- amídica, 35
- cooperativa, 202
- covalente, 7, 9
- cruzada de antígenos, 990
- de ligantes, 1038
- de peptídios, 100
- de ponta, 980
- de um antígeno pequeno, 993
- do ferro-oxigênio, 200
- glicosídica, 328
- N-glicosídica, 328
- não covalente, 9
- O-glicosídica, 328
- peptídica, 35
- PLP-base de Schiff, 623
- retinal-lisina, 975
Ligante, 404, 1038
LINES, 161
Linfócito
- B (célula B), 987
- T
- - auxiliar, 988
- - citotóxico, 988
Linfotactina, 57
Lipid raft, 365
Lipídios
- ácido graxo, 348
- balsa lipídica, 365
- bicamada lipídica, 354
- biossíntese dos
- - 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase, 774
- - 3-isopentenil pirofosfato, 774
- - ceramida, 770
- - cerebrosídio, 770
- - citidina difosfodiacilglicerol, 767
- - colesterol, 773
- - endocitose mediada por receptor, 781
- - esfingolipídio, 769
- - fosfatidato, 766
- - fosfolipídio, 767

- - gangliosídio, 770
- - hormônios esteroides, 786
- - lipoproteína
- - - de alta densidade, 779
- - - de baixa densidade, 779
- - mevalonato, 773
- - mono-oxigenase do citocromo P450, 788
- - partículas de lipoproteínas, 778
- - pregnenolona, 789
- - proteína de ligação do elemento regulador de esterol, 776
- - sais biliares, 785
- - transporte reverso do colesterol, 784
- - triacilglicerol, 767-cerebrosídio, 352
- clatrina, 367
- colesterol, 352
- difusão lateral, 361
- endocitose mediada por receptor, 367
- endossomo, 368
- esfingomielina, 351
- esfingosina, 350
- fosfoglicerídio, 350
- fosfolipídio, 350
- gangliosídio, 352
- glicolipídio, 350
- gráfico de hidropatia, 362
- lipossomo, 355
- modelo do mosaico fluido, 364
- molécula anfipítica, 353
- proteína
- - integral de membrana, 357
- - periférica de membrana, 358
- - SNARE, 368
- receptor de transferrina, 368
- transferrina, 368

Lipoproteína
- de alta densidade (HDL), 779
- de baixa densidade (LDL), 779

Lipossomo, 355
Lisina, 32
Lisossomo ingurgitado de glicogênio, 639
Lisozima, Anticorpos contra a, 994
Locus da cadeia leve k, 995
Lovastatina, 1049

M

MAC, 605
Macromolécula biológica, 4
Magnésio, 596
Malária, 212, 342
Malato sintase, 523
MALDI, 93
Malonil-CoA, 661
Maltose, 329
Mapa de densidade eletrônica, 102

Mapeando um trajeto, 1032
Marcadores
- de afinidade, 243
- fluorescentes, 91
Matriz de substituição, 180
MDR, 380
Mecanismo
- concertado, 296
- da fosforilase, 623
- da transaldolase, 610
- de biossíntese da parede celular desestruturado pela penicilina, 1046
Mediador, 948, 949
Megabases, 943
Meia-vida da excreção de um fármaco, 1044
Melting, 122
Membrana(s)
- biológicas, 347
- de archaea, 352
- planar de bicamada, 356
- tilacoide, 571
Memória imunológica, 1010
β-mercaptoetanol, 51
6-mercaptopurina, 1056
Metabolismo, 1042
- adenosina trifosfato, 434
- adição a ou formação de ligações duplas, 449
- anabolismo, 432
- carga energética, 450
- carreador ativado, 442
- catabolismo, 432
- ciclo de fome-saciedade, 813
- colecistocinina, 801
- de fármacos, 1042
- de primeira passagem, 1043
- diabetes
- - tipo 1, 805
- - tipo 2, 805
- estresse do retículo endoplasmático, 808
- fosforilação oxidativa, 441
- fototrófico, 432
- homeostasia
- - calórica, 797
- - da glicose, 813
- insulina, 802
- intermediário, 431
- leptina, 802
- liase, 449
- metabolismo ou metabolismo intermediário, 431
- peptídio semelhante ao glucagon 1, 801
- potencial
- - de fosforilação, 450
- - de transferência de grupo fosforila, 437
- quimiotrófico, 432
- reação

- - de isomerização, 448
- - de ligação, 447
- - de oxirredução, 447
- - de transferência de grupo, 448
- - hidrolítica, 448
- resistência
- - à insulina, 805
- - à leptina, 803
- resposta às proteínas não enoveladas, 808
- síndrome metabólica, 806
- via anfibólica, 433
- vitamina, 445
Metabólito, 4
Metabolon, 516
Metaloproteases, 266
Metamioglobina, 200
Metandrostenolona, 954
Metilação do DNA, 724
Metilases, 279
3-metilbutano-1-tiol, 966
Metionina, 30, 697
Método(s)
- baseados em conhecimento, 56
- didesoxi de Sanger, 145
- em fase sólida, 100
Metoprolol, 1055
Mevalonato, 773
MHC, 1000
Micela, 354
Micro RNA (mirna), 126
Microarranjo de DNA, 164
Microcorpo, 597
Micronutrientes, 22
Microrna (miRNA), 126, 878, 959
Microscopia
- de fluorescência, 92
- imunoeletrônica, 93
Microtúbulo, 1026
- disposição dos, 1027
- estrutura do, 1026
- movimento da cinesina ao longo de um, 1029
Mieloma múltiplo, 88
Miofibrila, 1024
Miogenina, 167
Mioglobina, 47, 198
Miopatia, 1048
Miosina, 1016
- ao longo da actina, movimento, 1024
- braço de alavanca da, 1026
- cadeias leves de, 1017
- dissecção da, 1017
- estrutura da, 1016, 1017
- super-hélice de duas fitas da, 1018
MiRNA, 126, 959

Mitocôndrias, 133
Modelo(s)
- concertado, 204
- coordenado, 204
- de bola e cadeia, 390
- de filamentos deslizantes, 1025
- de nucleação-condensação, 55
- de preenchimento espacial, 24
- do mosaico fluido, 364
- em esferas e bastões, 24
- em trombone, 839
- MWC, 204
- óperon, 930
- sequencial, 205, 296
- Watson-Crick do DNA em dupla hélice, 116
Moderação da fluidez da membrana, 363
Modificação(ões)
- covalente, 299
- - reversível, 292
- pós-traducionais, 86
Modulador seletivo de receptor de estrôgeno (MSRE), 954
Molde, 123, 826
Molécula(s)
- anfipáticas, 353
- apolares, 11
- de sabores, 970
- isoladas de miosina, 1022
- relaxada, 119
Monitoramento dos movimentos mediados pela cinesina, 1028
Mono-oxigenase do citocromo P450, 788
Monômero de fibrina, 310
Monossacarídio, 322
Monóxido de carbono, 207
Morfina, 1040
- regras de Lipinski, 1040
Morte celular programada, 305, 563
Motivo, 49
- de ativação de imunorreceptor com base em tirosina (ITAM), 997
- hélice-volta-hélice, 929
Motor flagelar, 1031
- componentes do, 1031
Motores moleculares
- actina, 1020
- - F, 1020
- - G, 1020
- braço de alavanca, 1019
- captura óptica, 1023
- CheY, 1032
- cinesina, 1016
- - convencional, 1018
- citoesqueleto, 1015
- complexo de troponina, 1024
- concentração crítica, 1022
- dineína, 1016

- flagelina, 1030
- FliG, 1031
- fragmento S1, 1017
- hélice relé, 1019
- instabilidade dinâmica, 1027
- microtúbulo, 1026
- miofibrila, 1024
- miosina, 1016
- movimento de força, 1023
- par MotA–MotB, 1031
- pescoço conector, 1020
- quimioatraente, 1032
- quimiorrepelente, 1032
- quimiotaxia, 1032
- sarcômero, 1024
- tropomiosina, 1024
- tubulina, 1027

Movimento
- atômico no retinal, 976
- da cinesina ao longo de um microtúbulo, 1029
- da miosina ao longo da actina, 1024
- de força (*power stroke*), 1023
- do braço de alavanca, 1019
- no interior de células, 1016

mRNA do receptor de transferrina, 958
mRNA, 125
MSRE, 954
Mucinas, 332, 335
Mucopolissacaridoses, 334
Mucoproteínas, 332
Mudança de classe, 999
Multiplicidade enzimática, 730
Mutação pontual, 158
Mutagênese
- de cassete, 158
- sítio-dirigida, 158

Mutagênico, 843
Mycobacterium tuberculosis, 148, 683

N

N-acetilglutamato, 690
Na^+–K^+ ATPase, 376
NADH, 69
- - coenzima Q oxidorredutase (complexo I), 537

Neck linker, 1020
Neuroglobina, 214
Neurônios olfatórios convergentes, 969
Neutrotransmissor, 391
NHEJ, 847
Nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida, 69
Nível de purificação, 77
NO, 733
Nociceptor, 981
Northern blotting, 142, 144

Nucleosídio, 113
- fosforilase, 759
Nucleossoma, 945
Nucleotídio, 112, 113
- biossíntese de
- - 5-fosforribosil-1-pirofosfato, 744
- - carbamoil fosfato sintetase, 743
- - defeito do tubo neural, 761
- - di-hidrofolato redutase, 755
- - enovelamento do tipo ATP grasp, 743
- - espinha bífida, 761
- - glutamina fosforribosil amidotransferase, 747
- - gota, 759
- - imunodeficiência combinada grave, 759
- - orotidilato, 745
- - ribonucleotídio redutase, 751
- - síndrome de Lesch-Nyhan, 760
- - timidilato sintase, 754
- - via de recuperação, 746
- pirimidínico, 742
- purínico, 746
Número
- de ligação, 832
- de renovação, 236
- variável de repetições em série, 335

O

Olfação, 966
Oligopeptídios, 36
Oligossacarídio, 329
Omeprazol, 1054
Oncogene, 422
Ondas dispersas, 101
Operador lac, 931
Opsina, 974
ORC, 841
Organização proteica complexa, 28
Origem de replicação, 840
Orotidilato, 745
Ortólogo, 177
Osteoartrite, 334
Osteogênese imperfeita, 47
Osteogenesis imperfecta, 47
Osteomalacia, 792
Otimização de compostos, 1051
Ouabaína, 379
Oxaloacetato, 695
Oxi-hemoglobina, 204
Oxidação, 1042
Oxidação-redução, 532
Óxido nítrico, 733, 734
Oxidorredução, 532
Oxigenoterapia hiperbárica, 208
Oximioglobina, 198

P

P680, 577
P700, 580
P960, 575
Padrão molecular associado a patógeno, 986
Paladar, 970
Palíndromo, 143
PAMP, 986
PAPS, 1043
Par especial, 574
Par MotA–MotB, 1031
Paracetamol
- toxicidade do, 1045
Paradoxo de Levinthal, 55
Parálogo, 176
Paraplexia enzoótica em ovelhas, 58
Pares específicos, 7
Partícula(s)
- central do nucleossoma, 945, 946
- de reconhecimento de sinal, 126, 918
- de ribonucleoproteína nuclear pequena (snrnp), 881
- de lipoproteínas, 778
Patch clamp, 248, 385
Patógeno intracelular, 999
PCR quantitativa, 163
Pectina, 331
Penicilina, 246, 1045
- mecanismo de biossíntese da parede celular desestruturado pela, 1046
Penicillium notatum, 1045
Pentose, 322
Peptidase sinal, 918
Peptídio(s), 36
- de proteínas
- - citoplasmáticas, 1000
- - internalizadas, 1004
- semelhante ao glucagon 1 (GLP-1, 801
- sobrepostos, 84
Pequeno RNA de interferência, 126
Perforina, 1004
Periplasma, 367
Permeabilidade seletiva, 347
Permeabilização da membrana mitocondrial externa (PMME), 563
Peroxissomo, 597, 656
- entre dois cloroplastos, 597
Pescoço conector, 1020
Pesquisa BLAST, 183
PFK, 462
pH, 15
Pigmentos
- dos cones, 977
- visuais, 978
PIP_2, 410
Pirâmide alimentar, 22
Pirano, 324

Piranose, 324
Piridoxal fosfato, 622, 623, 685, 718
Piridoxamina fosfato (PMP), 686
Pirimidina, 113
Piruvato, 695
- carboxilase, 486
- quinase, 469, 478, 480
PKA, 303, 408, 630
PKC, 411
Placas amiloides, 58
Planejamento de fármacos com base na estrutura, 1051
Planta
- C_3, 604
- C_4, 604
Plasmídio, 150
- indutor de tumor, 169
- Ti, 168, 169
Plasmina, 314
Plasminogênio, 314
Plasmodium falciparum, 212, 342
PLP, 623, 685
PMME, 563
PMP, 686
Polaridade, 36
Polianfólitos, 75
Poliligação, 152
Polímero linear, 6, 35, 112
Polimorfismo, 149
- dos comprimentos de fragmento de restrição, 149
- nas proteínas MHC da classe I, 1007
Polissacarídio, 330
Polissomo, 912
Ponte de hidrogênio, 10
Ponte dissulfeto, 36
Ponto isoelétrico, 75
Pool de Q, 537
Porfiria, 736
- eritropoética congênita, 736
- intermitente aguda, 737
Porfirinas, 736
Porfobilinogênio, 734
Poros nucleares, 367
Potencial
- de ação, 384
- de equilíbrio, 393
- de fosforilação, 450
- de membrana, 375
- de redução, 532
- de transferência de grupo fosforila, 437
- eletroquímico, 375
Power stroke, 1023
PP1, 635
Pré-mRNA, 876
Precipitação, 70

Predição *ab initio*, 56
Predisposição, 22
Pregnenolona, 789
Pressão parcial, 201
Primase, 829
Primeiro mensageiro, 404
Primer, 827
Príon, 58
Procarionte, 5
Procariotos
- atenuação, 936
- autoindutor, 936
- biofilme, 936
- correpressor, 933
- b-galactosidase, 930
- indutor, 932
- isopropiltiogalactosídeo, 932
- modelo óperon, 930
- motivo hélice-volta-hélice, 929
- operador lac, 931
- proteína ativadora de catabólitos, 933
- quorum sensing, 936
- repressão de catabólitos, 933
- repressor, 930
  - - lac, 931
  - - pur, 932
Processividade, 837
Processo(s)
- de automontagem, 354
- de desenvolvimento, 305
Procolagenase, 305
Procolágeno, 305
Produção de imunoglobulina, 987
Produtos finais de glicosilação avançada, 328
Proenzimas, 292, 305
Proinsulina, 305
Projeções de Haworth, 325
Prolil-hidroxilase, 819
Prolina, 30
Propriedades
- ADME, 1039
- da água, 10
Prostaglandina, 668
Proteassoma, 681, 682
- 26S, 681
Proteína(s), 4, 28
- adaptadoras, 416
- analisador de massa por tempo de voo, 94
- anticorpo, 86
  - - monoclonal, 88
  - - policlonal, 88
- antígeno, 87
- ativadora
  - - de catabólitos (CAP), 933

- - de gtpase (GAP), 420
- atividade específica, 69
- carreadora de acila (ACP), 661
- coeficiente de sedimentação, 78
- com super-hélices, 44
- com zíper de leucina básica (bZip), 948
- cristalografia de raios X, 100
- cromatografia
- - de afinidade, 72
- - de filtração em gel, 71
- - de troca iônica, 72
- - líquida de alta pressão, 73
- da família Argonauta, 959
- de ligação
- - de glicanos, 339
- - do elemento regulador de esterol (SREBP), 776
- de resistência a múltiplos fármacos (MDR) (glicoproteína P), 380
- de revestimento, 920
- degradação de Edman, 83
- desacopladora (UCP), 560
- deslocamento químico, 103
- determinante antigênico, 87
- diálise, 71
- do MHC
- - da classe I, 1000
- - da classe II, 1004, 1005
- eletroforese
- - bidimensional, 76
- - em gel, 73
- ensaio, 69
- - enzimático imunoabsorvente, 90
- espectrometria
- - de massa tandem, 95
- - por ressonância magnética, 103
- estabilizadora da cadeia a de hemoglobina (AHSP), 213
- estrutura e composição das
- - α-hélice, 40
- - L aminoácido, 29
- - ângulo de torção, 39
- - ângulo phi, 39
- - ângulo psi, 39
- - cadeia lateral, 29
- - diagrama de Ramachandran, 39
- - domínio, 49
- - elevação, 41
- - estrutura primária, 37
- - estrutura quaternária, 50
- - estrutura secundária, 40
- - estrutura terciária, 47
- - fita β, 43
- - folha β pregueada, 42
- - íon dipolar, 29
- - ligação peptídica, 35
- - motivo, 49

- - ponte dissulfeto, 36
- - príon, 58
- - proteína intrinsecamente desestruturada, 56
- - proteína metamórfica, 57
- - repetição em héptade, 45
- - subunidade, 50
- - super-hélice, 45
- - transição cooperativa, 54
- - volta reversa, 44
- fenil isotiocianato, 83
- ferro-enxofre
- - ferro não heme, 510
- - ferro não hêmico, 538
- fluorescente verde (GFP), 92
- focalização isoelétrica, 75
- fosfatase, 292, 302
- - 1 (PP1), 635
- G, 407
- - pequena, 419
- homogenato, 69
- integral de membrana, 357
- intrinsecamente desestruturadas, 56
- ionização
- - por *electrospray*, 93
- - dessorção a *laser* assistida por matriz, 93
- ligante de IRE (IRP), 958
- mapa de densidade eletrônica, 102
- metamórficas, 57
- método em fase sólida, 100
- microscopia de fluorescência, 92
- motora isolada em ação, 1023
- peptídios sobrepostos, 84
- periféricas de membrana, 358
- ponto isoelétrico, 75
- precursora de amiloide, 59
- proteína fluorescente verde, 92
- proteoma, 68
- quinase, 292, 300
- - A, 303, 408, 630
- - C, 411
- - dedicadas, 301
- - dependente de AMP, 670
- - dependente de calmodulina (quinase CaM), 413
- - multifuncionais, 301
- rho (ρ), 866
- *salting out*, 70
- síntese de
- - aminoacil-tRNA sintetase, 894
- - anticódon, 895
- - centro de peptidil transferase, 909
- - códon, 895
- - fator
- - - de alongamento
- - - – G, 910

- - - – Ts, 909
- - - – Tu, 908
- - - de iniciação, 908
- - - de liberação, 912
- - hipótese da oscilação, 898
- - partícula de reconhecimento de sinal, 918
- - peptidase sinal, 918
- - polissomo, 912
- - proteínas de revestimento, 920
- - receptor de SRP, 918
- - ribossomo, 893
- - RNA transportador, 895
- - sequência
- - - de Shine-Dalgarno, 907
- - - sinal, 918
- - subunidade
- - - 30S, 903
- - - 50S, 903
- - tradução, 893
- - translocon, 919
- - t-SNARE, 920
- - vesícula de transporte, 919
- - v-SNARE, 920
- TAP (transportador associado ao processamento de antígeno), 1000
- total, 77
- transformada de Fourier, 102
- troca de
- - ânions, 72
- - cátions, 72
- *Western blotting*, 91
Proteoglicano, 332, 334
Proteólise, 222
Proteoma, 68
Proto-oncogene, 422
Protonação do tampão, 18
Protoporfirina, 198
- IX, 735
Protrombina, 312
Protuberâncias, 311
PRPP, 744
PS I, 576
PS II, 576
Pseudogene, 161
Purificação de proteínas, 68
Purina, 113

Q

Q, ubiquinona, 532
qPCR, 163
Quilobase, 126
Quilocaloria, 225
Quilodálton, 36
Quilojoule, 225
Química combinatória, 190, 1049

Quimioatraente, 1032
Quimiorrepelente, 1032
Quimiotaxia, 1032
- sinalização da, 1033
Quimiotripsina, 188, 257
Quimiotripsinogênio, 259, 306
Quimiotrófico, 432
Quinase(s), 461
- CaM, 413
- do receptor beta-adrenérgico, 410
- reguladas por sinais extracelulares (ERK), 420
Quirais, 29
Quorum sensing, 936

R

R-carvona, 966
Radiação síncrotron, 101
Ranitidina, 1053
Raquitismo, 792
Ras, 408
Razão k_{cat}/K_M, 237
Reação(ões)
- ácido-base, 15
- anabólicas, 432
- anaplerótica, 520
- bimoleculares, 232
- catabólicas, 432
- catalisada pela fosfoglicomutase, 625
- colateral de desperdício, 597
- de conjugação, 1043
- de duplo deslocamento (em pinguepongue), 239
- de fase clara, 570
- de fotorrespiração, 597
- de isomerização, 448
- de ligação, 447
- de modificação química, 258
- de obscuridade, 593
- de oxirredução, 447
- de primeira ordem, 231
- de pseudoprimeira ordem, 232
- de transferência de grupo, 448
- em cadeia da polimerase, 142, 147
- em pingue-pongue, 239
- hidrolítica, 448
- sequencial, 238
Reagente específico de grupo, 243
RecA, 851
Receptor(es)
- acoplado à proteína G, 406
- beta-adrenérgico, 406
- com sete hélices transmembrânicas, 406
- de acetilcolina, 391
- de capsaicina, 981
- de capsaicina, 981

- de célula B, 997
- de célula T, 1002
- de EGF, 417
- de insulina, 414
- de manose 6-fosfato, 340
- de sabor amargo, 972
- de SRP, 918
- de tirosina quinase, 414
- de transferrina, 368, 957
- do HIV, 1007
- heterodimérico para sabor doce, 972
- nuclear de hormônio, 952
- odoríferos, 967
  - - regiões conservadas e variantes, 968
  - - padrões de ativação de, 969
- semelhante a Toll, 986
- serpentinos, 406
- 7TM análogos, 976

Recombinação
- homóloga, 166, 978
- V(D)J, 996
- VJ, 995

Recombinase, 851
Recrutamento do coativador, 954
Redox, 532
Reflexos, 101
Regeneração da ribulose 1,5-bifosfato, 600
Região(ões)
- conservadas e variantes nos receptores odoríferos, 968
- constante, 992
- determinante de complementaridade (CDR), 992
- promotora, 128
- variável, 991, 992

Regras
- de Lipinski, 1040
  - - morfina, 1040
- de pareamento de bases, 116

Regulação
- cascata enzimática, 309
- cooperatividade, 291
- da fosforilase, 626
- efeito
  - - heterotrópico, 298
  - - homotrópico, 296
- inibição por retroalimentação, 293
- isoenzima, 298
- mecanismo concertado, 296
- modelo sequencial, 296
- modificação covalente, 299
- pela insulina, 671
- por adenilação, 731
- proteína
  - - fosfatase, 302
  - - quinase, 300

- - - A, 303
- sequência
- - de consenso, 301
- - de pseudossubstrato, 303
- sítio alostérico, 293
- via
- - extrínseca, 310
- - intrínseca, 310
- zimogênio, 305
Relaxamento muscular, 1047
Remodelagem
- da cromatina, 956
- do glicogênio, 624
Rendimento, 77
Reorganização de éxons, 135
Reparo
- de pareamento impróprio, 846
- direto, 846
- por excisão
- - de bases, 846
- - de nucleotídios, 846
Repetição(ões)
- de trinucleotídios, 848
- em héptade, 45
- invertidas, 277
Replicação, 115
- do DNA, 8
- semiconservativa, 120
Representações moleculares, 24
Repressão de catabólitos, 933
Repressor, 930
- lac, 931
- pur, 932
Repulsão eletrostática, 437
Reservatório de hexose monofosfato, 598
Resíduos de ancoragem, 1001
Resistência
- à insulina, 805
- à leptina, 803
- a múltiplos fármacos, 380
Resolução, 102
Respiração celular, 530
Resposta
- à alimentação, 671
- ao exercício, 203
- às proteínas não enoveladas, 808
- imune
- - celular, 988
- - humoral, 987
Ressonância magnética funcional, 199
Retículo endoplasmático, 335, 367
Retinal, 974
- movimento atômico no, 976
Retroalimentação

- cumulativa, 731
- positiva, 480
Retrovírus, 124, 165
Ribonuclease bovina, 51
Ribonucleoproteína nucleolar pequena (snornp), 876
Ribonucleotídio redutase, 751
Ribose, 112
Ribossomo, 132, 893
Riboswitch, 866
Ribulose 1,5-bifosfato, 595, 600
- carboxilase/oxigenase, 595
Ribulose-5-fosfato, 605
RISC, 168
RM, 103
RMf, 199
RNA, 113
- amplificador, 875
- auto-*splicing*, 886
- bolha de transcrição, 859
- caixa TATA, 872
- catalítico, 885
- cauda poli(A), 877
- de interferência, 167
- domínio carboxiterminal, 871
- edição do RNA, 878
- fator de transcrição, 873
- mensageiro, 125
- microRNA, 878
- nuclear pequeno, 126, 881
- partícula de ribonucleoproteína nuclear pequena, 881
- polimerase, 126, 858
- pré-mRNA, 876
- proteína rho, 866
- ribonucleoproteína nucleolar pequena, 876
- ribossômico, 126
- riboswitch, 866
- sequência de consenso, 863
- sítio promotor, 858
- spliceossomo, 880
- *splicing*
  - - alternativo, 884
  - - do RNA, 878
- subunidade sigma, 863
- transcrição, 857
- transportador (tRNA), 126, 895
Rodopsina, 406, 974
- espectro de absorção da, 975
- quinase, 976
Rofecoxibe, 1052
Rosa, 966
Rossmann fold, 473
Rosuvastatina, 1049
Rotação do flagelo acoplada ao transporte de prótons, 1032
Rrna, 126

Rubisco, 595

S

S-adenosilmetionina, 722
S-carvona, 966
Sacarose, 329, 601
- síntese da, 602
Saccharomyces cerevisiae, 160
Sais biliares, 785
Salgado, 970
Salicina, 1047
Salmonella typhimurium, 1030
Salting out, 70
SAM, 722
Sarcômero, 1024
Sedo-heptulose 7-fosfato, 607
Segundo mensageiro, 404
Seleção
- cumulativa, 55
- de células T, 1008
- negativa, 1008
- positiva, 1008
Selectina, 341
Semelhança biológica, 4
Sentido do giro, 41
Separação
- das fitas, 147
- fotoinduzida de carga elétrica, 573
Sequência(s)
- Alu, 161
- amplificadoras, 129
- de consenso, 128, 301, 863
- de pseudossubstrato, 303
- de reconhecimento, 274
- de replicação autônoma, 153
- de Shine-Dalgarno, 907
- modelo, 186
- Shine-Dalgarno, 132
- sinal, 918
Sequenciamento, 145
- de DNA, 142
- do genoma humano, 19
SERCA, 376
Serina, 32, 300
Serpinas, 314
SH3, 419
Shuttle
- do glicerol 3-fosfato, 555
- do malatoaspartato, 555
Sigmoide, 202
Sildenafila, de cGMP, 1047
Simetria
- bilateral de rotação, 143
- rotacional bilateral, 277

Simportador, 382
Sinal de localização nuclear, 82
Sinalização da quimiotaxia, 1033
Sinapse de recombinação, 852
Síndrome
- de imunodeficiência humana, 1007
- de Korsakoff, 818
- de Lesch-Nyhan, 760
- do “QT” longo, 394
- metabólica, 806
- respiratória aguda grave, 1055
SINES, 161
Sinônimos, 131
Síntese
- da sacarose, 602
- de DNA, 147
- split-pool, 1049
Sirna, 126
Sistema(s)
- de restrição-modificação, 279
- imune
- - adaptativo, 985
- - inato, 985
- imunológico
- - alça hipervariável, 992
- - antígeno, 987
- - - carcinoembrionário, 1009
- - - leucocitário humano, 1000
- - β2-microglobulina, 1000
- - cadeia
- - - leve, 989
- - - pesada, 989
- - CD4, 1005
- - CD8, 1002
- - célula T, 999
- - - auxiliar, 1004
- - ciclosporina, 998
- - complexo principal de histocompatibilidade, 1000
- - determinante antigênico, 988
- - doença autoimune, 1009
- - endotoxina, 987
- - enovelamento de imunoglobulina, 992
- - Fab, 989
- - fagócito, 986
- - Fc, 989
- - flexibilidade segmentar, 990
- - granzima, 1004
- - hapteno, 998
- - imunoglobulina
- - - A, 991
- - - D, 991
- - - E, 991
- - - G, 989
- - - M, 990

- - linfócito
- - - B, 987
- - - T auxiliar, 988
- - - T citotóxico, 988
- - memória imunológica, 1010
- - motivo de ativação de imunorreceptor com base em tirosina, 997
- - mudança de classe, 999
- - padrão molecular associado a patógeno, 986
- - perforina, 1004
- - proteína
- - - do MHC da classe I, 1000
- - - do MHC da classe II, 1004
- - - TAP, 1000
- - receptor
- - - de células T, 1002
- - - semelhante a Toll, 986
- - recombinação V(D)J, 996
- - região
- - - constante, 992
- - - determinante de complementaridade, 992
- - - variável, 991
- - resposta imune
- - - celular, 988
- - - humoral, 987
- - seleção
- - - negativa, 1008
- - - positiva, 1008
- - sistema imune
- - - adaptativo, 985
- - - inato, 985
- - vacina(s), 1010
- - - de toxoides, 1010
- - - mortas ou inativadas, 1010
- - - subunitárias, 1010
- - - vivas atenuadas, 1010
- - vírus da imunodeficiência humana, 1007
- microssômico de oxidação do etanol, 817
- sensoriais
- - arrestina, 976
- - bastonete, 974
- - cGMP fosfodiesterase, 976
- - canal de Na+ sensível à amilorida, 973
- - canal iônico regulado por cGMP, 976
- - cone, 974
- - cromóforo, 975
- - célula pilosa, 979
- - epitélio olfatório principal, 966
- - esterecílio, 979
- - $G_{(olf)}$, 967
- - guanilato ciclase, 977
- - gustducina, 971
- - ligação de ponta, 980
- - nociceptor, 981
- - opsina, 974

- - receptor de capsaicina, 981
- - retinal, 974
- - rodopsina, 974
- - - quinase, 976
- - transducina, 976
Sítio(s)
- alostérico (regulador), 293
- ativo, 228, 229
- de especificidade do substrato, 306
- de ligação
- - de GAL4, 951
- - de peptídio do MHC da classe I, 1001
- - do amplificador, 949
- de reconhecimento, 274
- hipersensível, 950
- promotor, 858
- regulador, 293
SnoRNP, 876
SnRNA, 126, 881
SnRNP, 881
Solubilidade, 70
Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor, 368
Solução de Fehling, 327
Sonda de DNA, 144
Sonicação, 355
Soro, 88
Southern blotting, 142, 144
Spliceossomo, 134, 880
Splicing, 134
- alternativo, 135, 884
- do RNA, 878
SQTL, 394
SREBP, 776
SRP, 918
Staphylococcus aureus, 246, 1045
Streptomyces achromogenes, 143
Substâncias odoríferas, 968
Substituição, 158
- conservadora, 180
- não conservadora, 180
Substrato(s), 222
- cromogênico, 258
- do receptor de insulina, 415
Subtilisina, 188, 263
Subunidade, 50
- 30S, 903
- 50S, 903
- catalítica, 293
- regulatória, 294
- sigma (σ), 863
Succinato-coenzima Q redutase, 539
Succinil-CoA, 697
Suicida, 244
Sulfato de minoxidil, 1042

Sulfóxido de metionina, 309
Super-hélice, 45, 118, 119
- de duas fitas da miosina, 1018
Superespiralamento, 832
Superóxido dismutase, 545

T

t-SNARE, 920
TAF, 956
Talassemia, 212
- major, 212
Tamanho, 70
Tampão, 17
TATA box, 129
Tato, 981
Taxol, 1027, 1028
TCA, 501
Técnica de fixação de placas, 385
Telomerase, 126, 843
Telômero, 842
Temperatura de desnaturação, 122
Terminação do sinal, 405
Teste de Ames, 849
Testosterona, 791
Tetra-hidrobiopterina, 699
Tetra-hidrofolato, 721
Tetraubiquitina, 680
Tetrose, 322
Tiamina, 683
Timidilato, 114
- sintase, 754
Timidina, 113
Timina, 6
6-tioguanina, 1056
Tiorredoxina, 603
Tipo de célula, 944
Tirosina, 32, 700
- quinase, 414
Tiroxina, 952
TLR, 986
TOF, 94
Toll
- receptor semelhante a 986
- unidade de reconhecimento de PAMP do receptor semelhante a, 987
Topoisomerase, 834
Topoisômero, 832
Torção, 832
Torr, 202
Toxicidade, 1044
- do paracetamol, 1045
Traçado de Hill, 216
Tradução, 125, 893
Trajeto
- mapeando um, 1032

Transaldolase, 608
Transaminação, 686
Transaminase, 684
Transcetolase, 598, 608
Transcrição, 126, 857
Transcriptase reversa, 124, 156
Transcriptoma, 164
Transdução de sinais, 403
- adenilato ciclase, 408
- braço de dimerização, 418
- calmodulina, 412
- cascata de fosfoinositídio, 410
- comunicação cruzada, 404
- domínio de homologia
- - Src 2, 416
- - Src 3, 419
- fator de
- - crescimento epidérmico, 417
- - troca de nucleotídios de guanina, 419
- fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, 410
- fosfolipase C, 410
- gene supressor tumoral, 422
- insulina, 413
- ligante, 404
- mão EF, 412
- oncogene, 422
- primeiro mensageiro, 404
- proteína
- - adaptadora, 416
- - ativadora de GTPase, 420
- - G, 407
- - - pequena, 419
- - quinase
- - - A, 408
- - - C, 411
- - - dependente de calmodulina, 413
- proto-oncogene, 422
- quinase(s)
- - do receptor beta-adrenérgico, 410
- - reguladas por sinais extracelulares, 420
- Ras, 408
- receptor
- - acoplado à proteína G, 406
- - beta-adrenérgico, 406
- - com sete hélices transmembrânicas, 406
- - de EGF, 417
- - de insulina, 414
- - de tirosina quinase, 414
- rodopsina, 406
- segundo mensageiro, 404
- substrato do receptor de insulina, 415
- tirosina quinase, 414
- visuais, 976
Transdução de sinal, 403

Transducina, 976
Transferase, 624
- terminal, 156
Transferência gênica horizontal, 280
Transferrina, 368, 957
Transformação
- de fase I, 1043
- de fase II, 1043
- mediada por bombardeamento, 169
Transformada de Fourier, 102
Transglutaminase, 311
Transição cooperativa, 54
Translocase, 910
Translocon, 919
Transportador
- ABC, 380
- associado ao processamento de antígeno, 1000
- secundário, 382
Transporte
- ativo, 373
- - primário, 373
- - secundário, 373
- passivo, 373, 375
- reverso do colesterol, 784
Treonina, 32, 300
- desaminase, 729
Tretoses, 322
Triacilglicerol, 643, 767
Tríade catalítica, 260, 262
Triagem
- de alto rendimento, 1049
- de uma biblioteca de carboidratos sintetizados, 1050
Triglicerídio, 643
Trimetoprima, 756
Triose, 322
Tripsina, 307
Triptofano, 30, 700
tRNA, 126, 895
Troca
- de ânions, 72
- de cátions, 72
Trombina, 310
Tropomiosina, 1024
Tubulina, 1027

U

Ubiquitina, 679
UCP, 560
UDP
- - ácido α-D-glicurônico, 1043
- - glicose, 631
Ultracentrifugação, 78
Umami, 970
Unidade(s)

- bioquímica, 3
- de carboidrato, 59
- de energia, 225
- de glicoaldeído ativada, 609
- de reconhecimento de PAMP do receptor semelhante a Toll, 987
- Sverdberg, 78
Uniportador, 382
Uridina, 113
- difosfato glicose (UDP-glicose), 631

V

v-SNARE, 920
Vacina, 1010
- de toxoides, 1010
- mortas ou inativadas, 1010
- sintéticas, 159
- subunitárias, 1010
- vivas atenuadas, 1010
Valina, 30
Valor de pKa, 17
Varfarina, 312
Variações sobre um tema, 1005
Veia porta, 1044
Velocidade máxima, 234
Vesícula
- de transporte, 919
- lipídicas, 355
Vetor(es), 150
- de clonagem, 151
- de expressão, 152
Via
- anfibólica, 433
- C_4, 604
- da β-oxidação, 650
- das pentoses fosfato
  - - aldolase, 599
  - - amido, 601
  - - autótrofo, 594
  - - ciclo de Calvin, 593
  - - fotorrespiração, 598
  - - glicose 6-fosfato desidrogenase, 605
  - - glutationa, 613
  - - heterótrofo, 594
  - - metabolismo ácido das crassuláceas, 605
  - - peroxissomo, 597
  - - planta C_3, 604
  - - planta C_4, 604
  - - reservatório de hexose monofosfato, 598
  - - rubisco, 595
  - - sacarose, 601
  - - tiorredoxina, 603
  - - transcetolase, 598
- de biossíntese do heme, 735
- de C_4, 604

- de pentose fosfato, 605
- de recuperação, 746
- de relaxamento muscular, 1047
- extrínseca, 310
- intrínseca, 310
Vibrio cholerae, 423
Vioxx®, 1052
Vírions, 152
Vírus
- da imunodeficiência humana, 1007
- da influenza aviária H5N1, 342
- da leucemia murina de Moloney, 165
- da Vaccinia, 165
- do sarcoma de Rous, 422
- influenza, 341
Visão, 974
Vitamina(s), 22, 445
- B12 (cobalamina), 654
- C, 819
- D, 792
- K, 312
Vmáx. (velocidade máxima), 234
Volta
- β, 44
- em forma de U, 44
- reversa, 44
VR1, 981

W

Western blotting, 91

X

Xantinoxidase, 759

Z

Z-DNA, 118
Zimogênio, 292, 305
Zinco, 269
Zingibereno, 966
Zíper de leucina básica, 948
Zwitterion, 29
Zwitteríons, 29